

5.4. Quantifizierung von mRNA-Mengen nach Hitzeschock

a) Quantifizierung von Transkripten der im *differential display* identifizierten Gene

Die Transkriptmengen von 18 Genen, die im *differential display* identifiziert worden waren, wurden in einer quantitativen PCR bestimmt. Hierfür wurde die RT-PCR (*reverse transcription polymerase chain reaction*) verwendet, mit der die relative Zunahme der gebildeten mRNA vor und nach Hitzeschock vermessen und ins Verhältnis zueinander gesetzt wurde. Als Matrize dienten gleiche Mengen RNA, die nach 0, 5, 15 und 30 Minuten Hitzeschock isoliert und unter den gleichen Bedingungen wie für die DD-PCR in cDNA revers transkribiert worden war. Es wurden genspezifische Primer (18-mere) verwendet, die der Amplifizierung einer kurzen Region von 150-500 Nukleotiden am 3' Ende der cDNA dienten (d.h. am 5' Ende der mRNA). Die Primersequenzen sind im Abschnitt Material aufgeführt.

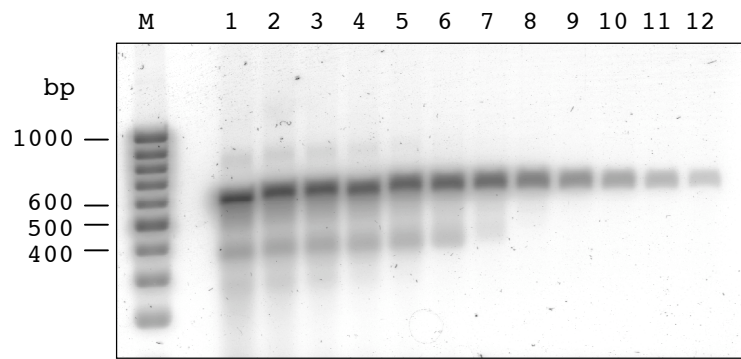
Da die angewendete PCR-Methode eine Endpunktbestimmung darstellte, musste zu Beginn der exponentielle Bereich der PCR für jedes untersuchte Primerpaar bestimmt werden, d.h. der Bereich, in dem sich die Menge an gebildetem PCR-Produkt nach jedem weiteren Amplifikationszyklus verdoppelt. Hierfür wurde zunächst ausgehend von 0,5 µl cDNA eine serielle Verdünnungsreihe hergestellt, die über eine konstante Anzahl von 26 Zyklen amplifiziert wurde. Für die Amplifizierung der Thermosom Untereinheiten alpha und beta wurden 19 Zyklen verwendet, da hier höhere Transkriptmengen als Matrizen zur Verfügung standen. Nach Ende der PCR-Reaktion wurden die Ansätze mit SYBR-Green gefärbt und nach elektrophoretischer Auftrennung die Fluoreszenzintensitäten der PCR-Produkte im Image-Reader (FLA-5000, Science Imaging Systems, Fujifilm) bestimmt. Der Fluoreszenzfarbstoff SYBR-Green besitzt eine höhere Sensitivität als Ethidiumbromid, was vorteilhaft für das Detektieren geringer DNA-Konzentrationen ist.

Die genaue Vorgehensweise der Quantifizierung soll im Folgenden am Beispiel von *tf55alpha* dargestellt werden (Abb. 9). Zu Beginn wurden mit zwei genspezifischen

Primern (P2TF55a.F57 und P2TF55a.R463) 440 bp der revers transkribierten und seriell verdünnten *tf55alpha* cDNA amplifiziert und diese elektrophoretisch aufgetrennt (Abb. 9A). Durch das Färben mit SYBR-Green verzögerte sich das Laufverhalten der DNA um ca. 200 bp, so dass die Amplifikate mit einer apparenten Grösse von 600 bis 700 bp im Agarosegel wanderten. Mit zunehmender Sättigung der PCR-Reaktion wurden vermehrt unspezifische Produkte gebildet (Abb. 9A, Spur 1-6).

Innerhalb des exponentiellen Bereiches der PCR-Reaktion war eine Verdopplung der Fluoreszenzintensität bei doppelter cDNA-Menge zu erkennen (Abb. 9A, Spur 7-12), d.h. es war ein linearer Zusammenhang zwischen der Menge des gebildeten PCR-Produktes und der Menge der als Matrize eingesetzten cDNA vorhanden. Dieser Zusammenhang zwischen zwei Werten wird durch die Lineare Regression berechnet. Als Maß für die Stärke der Abweichung von dieser linearen Funktion dient das Bestimmtheitsmaß R^2 . Bei einem stark positiven Zusammenhang ist dieser Wert nahe bei eins. Das ist bei einer PCR-Reaktion mit 100%iger Effizienz der Fall. Besteht kein Zusammenhang, dann ist R^2 nahe bei null.

Daher wurde die gemessene Fluoreszenz gegen die eingesetzte cDNA-Menge (in μ l) aufgetragen und mit Hilfe der Microsoft Excel-Software sowohl die Steigungsgleichung als auch das Bestimmtheitsmass (R^2) über lineare Regression bestimmt (Abb. 9B+C). Bei der qPCR der übrigen 17 Transkripte wurde ebenso verfahren. Das hierbei jeweils ermittelte R^2 lag zwischen 0,977 und 0,999 (Abb. 11).

**A**

Spur	μl cDNA	Fluoreszenz
1	5	407541
2	2,5	336607
3	1,25	265013
4	0,625	217218
5	0,3125	191554
6	0,15625	171189
7	0,078125	132848
8	0,039063	72728
9	0,0195315	38474
10	0,0097658	20432
11	0,0048829	10399
12	0,0024414	5278

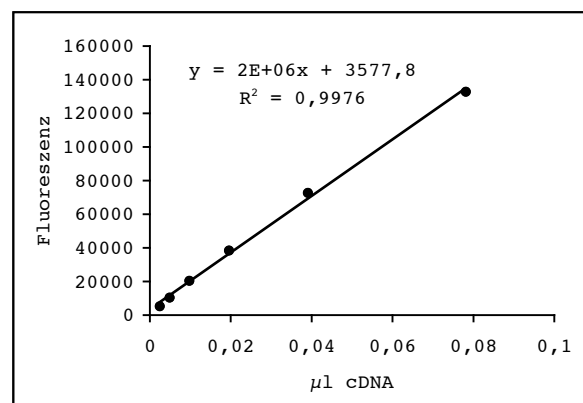
B**C**

Abbildung 9: Amplifizierung einer seriellen Verdünnungsreihe von *S. solfataricus* cDNA mit genspezifischen Primern für *tf55alpha*. **A.** Fluoreszenz elektrophoretisch aufgetrennter und mit SYBR-Green sichtbar gemachter PCR-Produkte. **B.** Fluoreszenzintensitäten der PCR-Produkte, die bei einer Wellenlänge von 432 nm im Image-Reader gemessen wurden. Fett hervorgehoben ist der Bereich der PCR-Reaktion, in dem sich die Fluoreszenzintensitäten der PCR-Produkte mit abnehmender Verdünnung der cDNA verdoppeln. **C.** Darstellung der linearen Funktion der PCR-Reaktion mit ermittelter Steigungsgleichung und Bestimmtheitsmass R^2 .

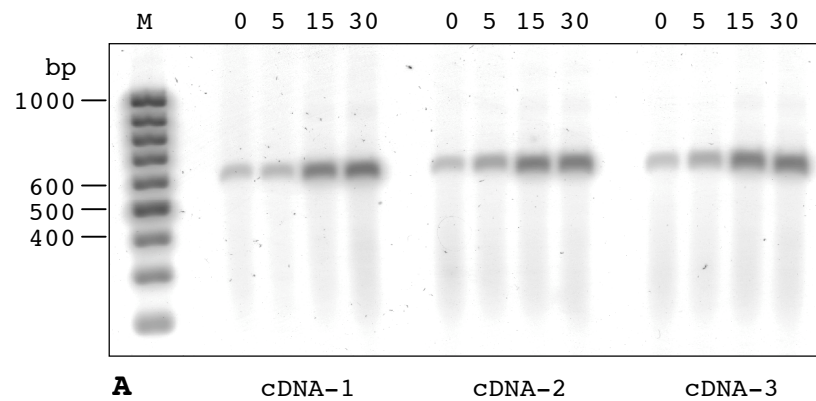
Die Quantifizierung der Transkripte erfolgte als Endpunktbestimmung in mindestens drei PCR-Reaktionen, für die unabhängig synthetisierte cDNA als Matrize verwendet wurde (Abb. 10A). Für die qPCR wurde die Anzahl der Amplifizierungsschritte entsprechend angepasst, indem über eine innerhalb des linearen Bereichs liegende cDNA-Menge auf die erforderliche Zyklenzahl umgerechnet wurde. Entsprechend waren für die Amplifizierung der *tf55alpha* Transkripte 10 Zyklen notwendig. Für die Bestimmung der relativen Induktion wurde folgende Formel angewendet:

$$\frac{\text{Fluoreszenz}_{\text{HS}}}{\text{Fluoreszenz}_0} = \text{Relative Induktion}^{(*)}$$

(*) Der Terminus Induktion wird hier verwendet, um erhöhte, relative mRNA-Mengen nach Hitzeschock zu beschreiben. Eine Erhöhung der mRNA-Stabilität kann ebenfalls zu einer erhöhten mRNA-Menge führen, obwohl keine Induktion auf transkriptioneller Ebene stattgefunden hat.

Aus drei Messungen wurde sowohl der Mittelwert als auch die Standardabweichung berechnet (Abb. 10B+C). So wurde für *tf55alpha* eine durchschnittliche Induktion von 2-fach nach 5 Minuten, 7,4-fach nach 15 Minuten und 10,4-fach nach 30 Minuten Hitzeschock bei 88°C ermittelt.

Bei der qPCR der restlichen Transkripte wurde analog verfahren. In Abbildung 11 sind die Ergebnisse aller quantifizierten mRNA-Spezies zusammengefasst. Insgesamt wurde eine Hitzeschockinduktion bei 13 von 18 identifizierten Genen festgestellt, wenn ein Grenzwert von 1,5 festgelegt wurde (s.a. Tab. 8). Die höchste Induktion war mit 10,4-fach bei *tf55alpha* zu beobachten. Längere Inkubation bis zu 60 Minuten bei 88°C resultierten in keiner weiteren Erhöhung der Transkriptmengen (nicht gezeigt). Alle weiteren untersuchten Gene waren mit 1,5- bis 3,1-fach nur moderat induziert. Die mRNA-Mengen von ORF SSO2874 waren nach Hitzeschock ebenfalls um 1,7-fach leicht erhöht. Diese Beobachtung deutete darauf hin, dass cDNA-Fragmente, die im *differential display* hohe aber unveränderte Mengen PCR-Produkt aufwiesen (siehe Tab. 7), sich bereits in der Sättigungsphase der PCR-Reaktion befanden.



HS (min)	Fluoreszenz cDNA-1	Fluoreszenz cDNA-2	Fluoreszenz cDNA-3
0	8740	7448	8886
5	11263	16330	20922
15	58601	63009	64058
30	85811	69707	65188

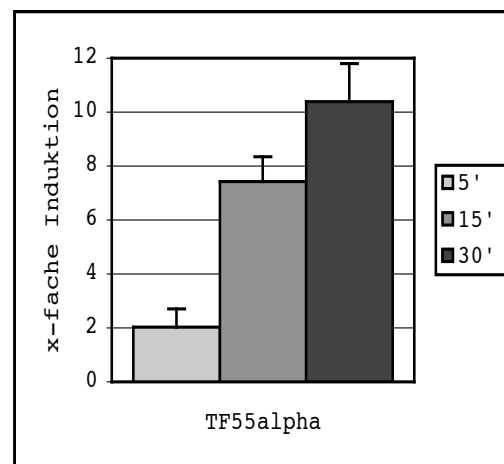
B

Abbildung 10: Quantifizierung von *tf55alpha* Transkripten vor (0') und nach Hitzeschock (5', 15', 30') bei 88°C. **A.** Elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte nach Amplifikation mit genspezifischen Primern über 10 Zyklen. Als Matrice dienten drei verschiedene cDNAs, die in unabhängigen Reaktionsansätzen synthetisiert worden waren. Die DNA wurde mit SYBR-Green gefärbt und im Image-Reader bei einer Wellenlänge von 432 nm sichtbar gemacht. **B.** Gemessene Fluoreszenz der einzelnen PCR-Produkte und **C.** graphische Darstellung der Hitzeschock-Induktion (Mittelwerte mit Standardabweichung).

In der qPCR wurden ähnliche Induktionsmuster von früh (Maximum nach 5-15 Minuten Hitzeschock) und spät (Maximum nach 30 Minuten) beobachtet, die auch mit DD-PCR erhalten worden waren (vergl. Tab. 7 und Abb. 11). Auffallend war vor allem ORF SSO1586, bei dem sowohl mit DD-PCR als auch mit qPCR die höchsten mRNA-Mengen 5 Minuten nach Hitzeschock festgestellt wurden. Als nicht induziert wurden die ORFs SSO0569, SSO1087 und SSO2241 betrachtet.

Für SSO1752 und SSO2087 konnte keine Induktion ermittelt werden, da in der qPCR mit den ausgewählten Primern entweder kein Produkt erhalten wurde oder kein linearer Zusammenhang zwischen amplifiziertem Produkt und eingesetzter cDNA-Menge in der PCR-Reaktion vorhanden war.

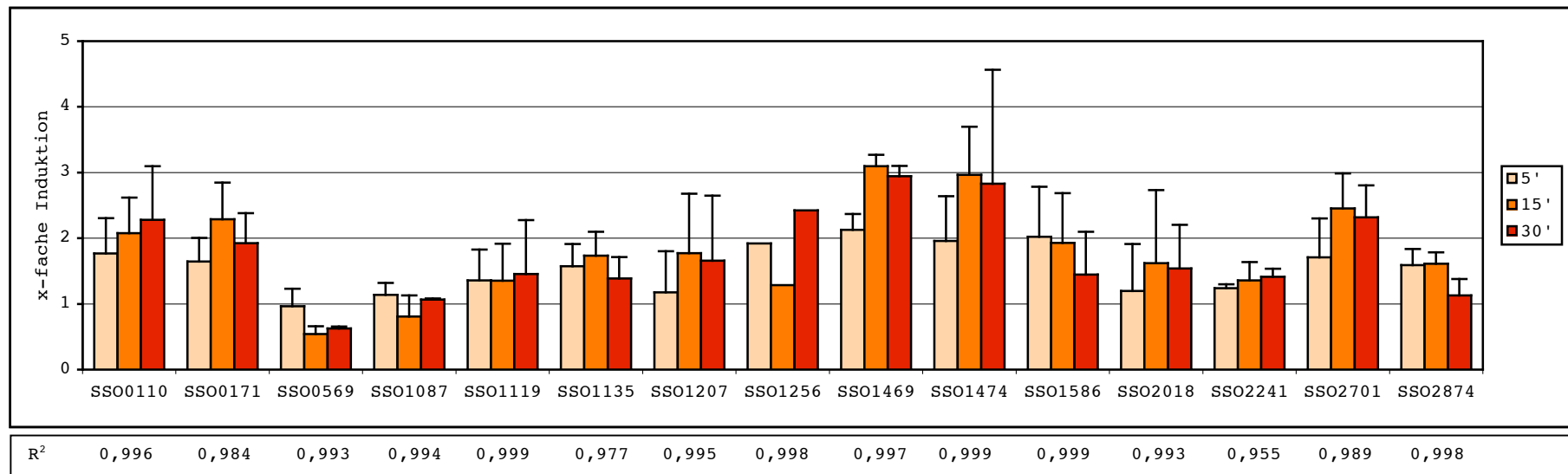


Abbildung 11: Relative Transkriptmengen 5, 15 und 30 Minuten nach Hitzeschock, die in der qPCR mit genspezifischen Oligonukleotiden ermittelt wurden. Die mRNA-Menge der Nullprobe wurde gleich 1 gesetzt. Zur Bestimmung der Mittelwerte wurden drei Messungen verwendet. Für den ORF SSO1256 konnte keine Standardabweichung bestimmt werden, da nur eine Messung vorlag. Das für die jeweilige qPCR ermittelte Bestimmtheitsmass R^2 ist unter dem Diagramm angegeben.

b) Quantifizierung von Transkripten ausgewählter Gene aus dem Genom von *S. solfataricus*

Um einen umfassenderen Einblick in die Hitzeschockantwort zu erhalten, wurden auch solche Gene von *S. solfataricus* in die Analyse einbezogen, die grosse Ähnlichkeiten mit bekannten Hitzeschockgenen aufwiesen. Zu den ausgewählten, potentiellen Hitzeschockproteinen (HSPs) gehörten die beta und gamma Untereinheit des Thermosoms, die Homologe der Chaperone Prefoldin, Hsp20-1 und Hsp20-2, die potentiellen Proteasen HtrA/DegP und HtpX. Ausserdem wurde untersucht, ob sich die mRNA der basalen Transkriptionsfaktoren TFB-1, TFB-2 und TBP unter Hitzeschock verändern.

Die Quantifizierung erfolgte als Endpunktbestimmung in einer qPCR mit genspezifischen Primern, wie es bereits im vorangegangenen Abschnitt beschrieben wurde. In Abbildung 12 sind die Mittelwerte der relativen Transkriptinduktionen dieser Gene dargestellt, die aus drei unabhängigen Messungen mit RNA, isoliert 0, 5, 15 und 30 Minuten nach Hitzeschock, hervorgegangen sind. Zum Vergleich sind die ermittelten Werte für *tf55alpha* ebenfalls aufgeführt. Die gemessene Induktion des Gens für die Thermosom-Untereinheit war mit 10,4-fach nach 30 Minuten Hitzeschock auch innerhalb der *hsp*-homologen Gene am grössten. Die mRNA der beta Untereinheit war nach 30 Minuten bis 5-fach erhöht. Das entsprach ungefähr dem halben, gemessenen Wert der alpha Untereinheit. Das Gen für die gamma Untereinheit wurde zwar unter Hitzeschock transkribiert, war jedoch nicht induziert. Die relative Menge der gamma mRNA verhielt sich abnehmend und erreichte einen Wert von 0,4-fach nach 30 Minuten.

Innerhalb der weiteren untersuchten Gene für Chaperone und Proteasen war das *htrA/degP*-Homolog mit 5,4-fach nach 30 Minuten Hitzeschock am stärksten induziert. Eine ähnlich moderate Induktion wie bei den meisten mit DD-PCR identifizierten Genen wurde bei den beiden *hsp20*-Homologen (2,5- bzw. 2,2-fach), *htpX* (2,6-fach) und dem Prefoldin-Gen (1,8-fach) gemessen. Unter den untersuchten Transkriptionsfaktoren wurde eine moderate Induktion der *tfb-1*-mRNA sichtbar

(Maximum nach 15 Minuten von 1,9-fach), wogegen die Transkriptmengen von *tfb-2* und *tbp* mit zunehmender Hitzeschockexposition abnahmen.

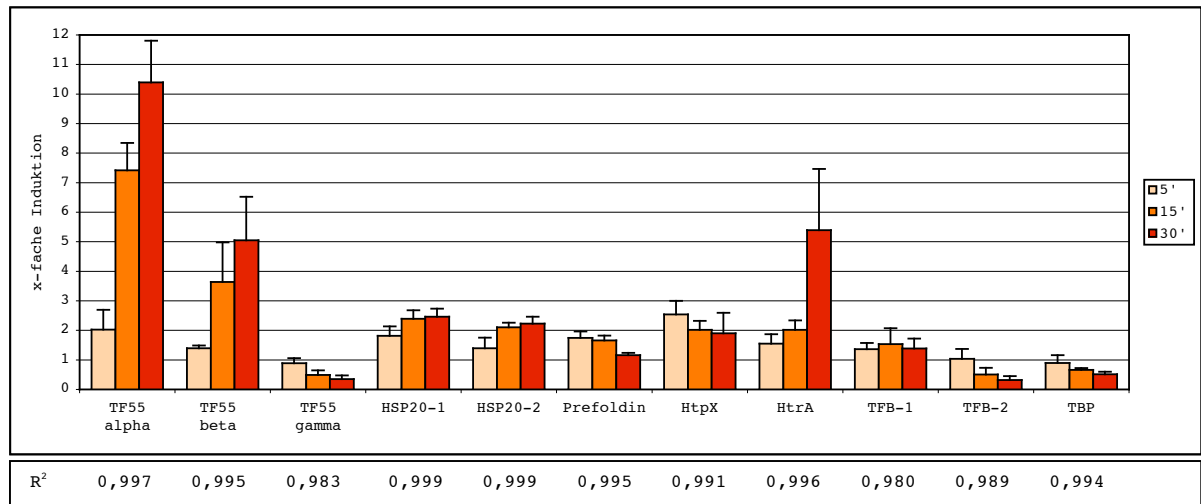


Abbildung 12: Relative Transkriptmengen *hsp*-homologer Gene und basaler Transkriptionsfaktoren aus dem *S. solfataricus* Genom, die nach 5, 15 und 30 Minuten Hitzeschock bei 88°C mit qPCR und genspezifischen Oligonukleotiden ermittelt wurden. Die Induktion der Nullprobe wurde gleich 1 gesetzt. Zur Bestimmung der Mittelwerte und Standardabweichungen wurden drei unabhängige Messwerte verwendet. Das für die jeweilige qPCR ermittelte Bestimmtheitsmass R^2 ist unter dem Diagramm angegeben.

5.5. Charakterisierung neu identifizierter Hitzeschockgene

Mit der *differential display* Methode wurden in dieser Arbeit 18 verschiedene Gene identifiziert, von denen mit quantitativer PCR 13 als induziert nach Hitzeschock ermittelt wurden (Übersicht in Tab. 8). Sieben Genprodukten konnte eine potentielle Funktion zugewiesen werden, die übrigen waren hypothetisch, aber teilweise innerhalb der Archaea konserviert.

Die alpha Untereinheit des Thermosoms (SSO0862) wurde in fünf Fragmenten mit drei verschiedenen Primerkombinationen am häufigsten in der DD-PCR identifiziert, was eine gute interne Kontrolle für die Hitzeschockreaktion in *S. solfataricus* darstellte.

Ein ebenfalls mehrmals detektiertes Gen war SSO1752, welches dreimal mit drei verschiedenen Primerpaaren nachgewiesen wurde. Die vor und nach Hitzeschock gebildeten mRNA-Mengen konnten mit qPCR aber nicht eindeutig bestimmt werden. Auffällig war jedoch, dass dieses Gen zusammen mit zwei weiteren, unabhängig voneinander identifizierten ORFs SSO1256 und SSO1469 zu einer Genfamilie gehört (Abb. 13). Die Induktion der jeweiligen mRNAs nach Hitzeschock betrug 2,4- bzw. 3,1-fach.

Vier weitere Gene im *S. solfataricus* Genom liessen sich dieser Familie zuordnen, deren abgeleitete Proteinsequenzen sich durch gut konservierte C-Termini auszeichnen und entfernte Ähnlichkeiten mit der RecB-Familie von Endonukleasen haben. Die Übereinstimmungen sind v.a. im strukturellen Zentrum und beim Endonuklease-Motif ExK zu finden (Aravind *et al.*, 2000). Bis auf eine Ausnahme (SSO1758) besitzen die *Sulfolobus*-Proteine unterschiedlich lange N-Termini mit coiled-coil Domänen, die jedoch weniger gut konserviert sind (Abb. 13 oben).

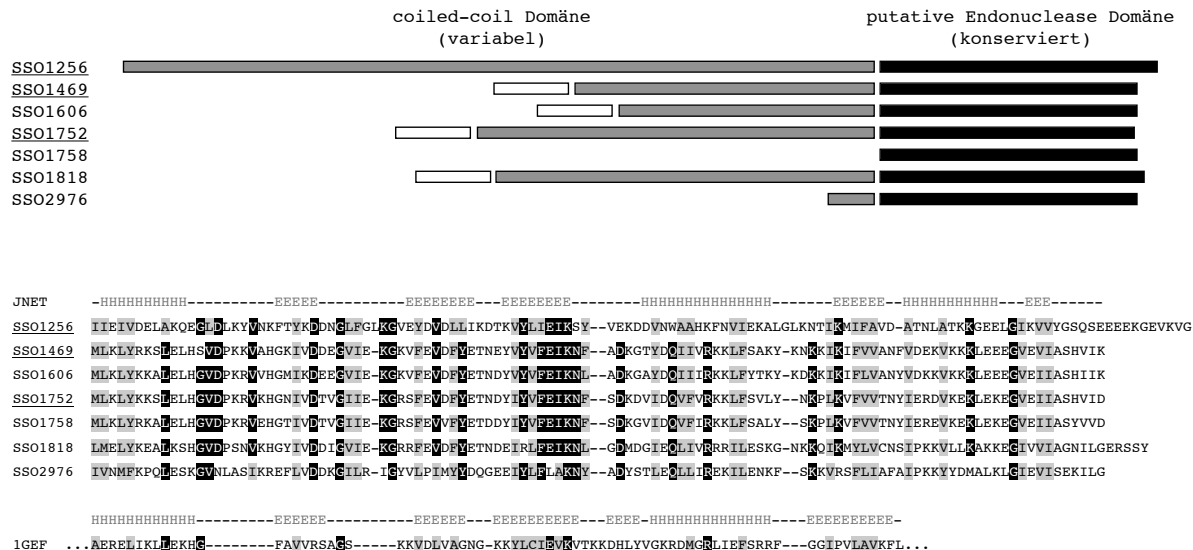


Abbildung 13: Coiled-coil Proteinfamilie mit den hitzeschockinduzierbaren Proteinen SSO1256, SSO1469 und SSO1752 (unterstrichen) aus *S. solfataricus*. **Oben:** Schematische Darstellung der variablen, N-terminalen coiled-coil Domänen (grau) und des konservierten C-Terminus (schwarz). In weiss ist ein kurzes, konserviertes Motiv im N-Terminus mit unbekannter Bedeutung dargestellt. **Unten:** Alignment der konservierten C-Termini mit putativer Endonuklease-Domäne. Konservierungen in mindestens 6 von 7 Proteinen sind schwarz, konservierte hydrophobe Positionen sind grau dargestellt. Darunter ist die am nächsten übereinstimmende Struktur gezeigt, die in der Protein Datenbank gefunden wurde (1GEF, archaeale Holliday Junction Resolvase Hjc aus *Pyrococcus furiosus*). Die alignierten Regionen beinhalten das strukturelle Zentrum von 1GEF und das Endonuklease-Motiv ExK, welche zu den am stärksten konservierten Regionen der *S. solfataricus* Proteine gehören. Identifizierte Sekundärstrukturen sind angegeben (H, Helix; E, Strang).

Die zwei hypothetischen Gene SSO1119 und SSO1586 wurden bisher ausschliesslich in den Genomsequenzen von *S. solfataricus* and *S. tokodaii* gefunden. Die Funktionen der dazugehörigen Genprodukte sind unklar. Sie waren mit 1,5- bzw 2,0-fach relativ moderat nach Hitzeschock induziert, wobei SSO1586 schon sehr früh nach 5 Minuten sein Induktionsmaximum erreichte. Dieses frühe Induktionsmuster wurde sowohl mit DD-PCR als auch mit quantitativer PCR erhalten.

Zwei weitere hypothetisch konservierte ORFs, SSO0110 und SSO0171, sind allein auf die Archaea beschränkt. Für die jeweilige mRNA wurde eine Zunahme von bis zu 2,4- bzw. 2,3-fach ermittelt. Eine Datenbank-Suche nach konservierten Domänen ergab, dass SSO0110 eine DUF- Domäne (*domain of unknown function*) mit unbekannter Funktion codiert, die zusammen mit zwei CBS-Domänen vorkommt (NCBI Datenbank). CBS-Domänen (benannt nach *Cystathionine Beta Synthase*; Bateman,

1997) werden meist in zwei oder vier Kopien innerhalb von Proteinen gefunden, die zu Paaren dimerisieren und eine stabile globuläre Einheit bilden. Sie sind mit einer Reihe verschiedener Proteindomänen assoziiert und besitzen möglicherweise eine regulatorische Rolle. Die DUF Domäne zeigt eine entfernte Verwandtschaft mit der HrcA Domäne des transkriptionellen Repressors von Hitzeschockproteinen aus Bakterien.

Das Gen für die hitzeinduzierbare, putative Transposase SSO1474 kommt in nur einer Kopienzahl im *S. solfataricus* Genom vor, ist jedoch in 7 Kopien im *S. tokodaii* Genom zu finden. Die mRNA der Transposase wird bis zu 3-fach nach Hitzeschock induziert. Ausserdem ist noch ein degeneriertes Fragment des N-Terminus dieser Transposase (SSO9043) im Genom vorhanden. SSO1474 überlappt um 14 Basen mit einem weiteren ORF (SSO1475), welcher ebenfalls für eine Transposase codiert und zum Insertionselement ISC1476 gehört. ISC1476 ist in 4 Kopien im Genom vertreten.

Die übrigen identifizierten, potentiellen *hsp*-Gene SSO1135, SSO1207, SSO2018, SSO2701, SSO2874 sind an verschiedenen physiologischen Prozessen beteiligt. Einige davon kommen zusammen mit anderen Genen aus dem gleichen Stoffwechselweg in einem Gencluster angeordnet vor. Die jeweiligen mRNAs sind nach Hitzeschock nur leicht erhöht (bis 1,8-fach; SSO2701 2,5-fach).

Das von SSO1135 codierte Protein ist mit Heterodisulfid-Reduktasen verwandt, die Schlüsselenzyme beim Elektronentransport und Energiemetabolismus in methanogenen Archaea darstellen. Man findet Homologe dieser Proteine in vielen verschiedenen Prokaryoten, die keine Methanogenese betreiben (Hedderich *et al.*, 1998). Ihre genaue Funktion ist hier jedoch unbekannt.

SSO1207 codiert für die alpha Untereinheit der Pyruvat-Synthase, eine Ferredoxin-Oxidoreduktase, welche für die oxidative Decarboxylierung von Pyruvat im Energie-Metabolismus zuständig ist. Dieser ORF ist mit den beiden für die beta und gamma Untereinheit codierenden ORFs in einem Gencluster angeordnet.

Das von SSO2018 codierte Protein ist mit einem bakteriellen Phenylacetat-abbauenden Protein (PaaA/PhaF) verwandt, welches am aeroben Katabolismus von Phenylacetat beteiligt ist und zu einem neuartigen, hybriden Stoffwechselweg in

Bakterien gehört (Ferrandez *et al.*, 1998; Olivera *et al.*, 1998). SSO2018 befindet sich mit weiteren Genen für den Phenylacetat-Abbau in einem bidirektionalen Gencluster (SSO2017 und SSO2019 bis 2022).

SSO2701 codiert ein Homolog von am Transport von Kohlenhydraten beteiligten Permeasen und besitzt eine LacY Domäne, die charakteristisch für Protonen/Zucker-Transporter ist.

SSO2874 codiert ein Protein, das mit Acetoacetyl-CoA Thiolasen (Synonym Acetyl-CoA Acetyltransferase) verwandt ist, die im Lipid-Metabolismus am Abbau kurzkettiger Fettsäuren beteiligt sind.

Tabelle 8: Zusammenfassung der nach Hitzeschock untersuchten *S. solfataricus* Gene

ORF	AS	Funktion, Proteinfamilie	Bemerkung	Vorkommen ¹	x-fache ² Induktion	max ³
Im differential display identifizierte Gene						
SSO0110	130	konserviert hypothetisch	2 CBS Domänen, DUF Domäne: verwandt mit hitzeinduzierbarem Repressor hrcA aus Bacteria	A	2.4 ± 0.7	30
SSO0171	189	konserviert hypothetisch		A	2.3 ± 0.5	15
SSO0862	559	Thermosom alpha UE	CCT-Tric Familie der Chaperonine	BAE	10.4 ± 1.4	30
SSO1119	419	hypothetisch	nur in Sso and Sto ⁴		1.5 ± 0.8	30
SSO1135	305	Heterodisulfid-Reduktase UE B (hdrB-2)	im Gencluster	AB	1.7 ± 0.3	15
SSO1207	385	Pyruvat-Synthase, alpha Kette	Gencluster mit gamma and beta UE	BA	1.8 ± 0.9	15
SSO1256	464	coiled-coil Protein	verwandt mit SSO1469 und SSO1752	(B)A	2.4	30
SSO1469	288	coiled-coil Protein	verwandt mit SSO1256 und SSO1752, nur in Crenarchaea und Cyanobacteria	(B)A	3.1 ± 0.2	15
SSO1474	133	Transposase, putativ	eine Kopie in Sso, 7 x in Sto ⁴	BA	3.0 ± 0.7	15
SSO1586	283	hypothetisch	nur in Sso und Sto ⁴		2.0 ± 0.8	5
SSO1752	330	coiled-coil Protein	verwandt mit SSO1256 und SSO1469	(B)A	-	-
SSO2018	256	Ring Oxidation Komplex/ Phenylacetat-Abbau verwandtes Protein (PaaA/PhaF)	im Gencluster mit weiteren Phenylacetat-Abbau verwandten Proteinen	B	1.7 ± 1.0	15
SSO2701	391	Permease, major facilitator superfamily	LacY-Domäne (pfam1306) von Protonen/Zucker-Transportern	BA	2.5 ± 0.5	15
SSO2874	395	Acetoacetyl-CoA Thiolase, acaB-9	Lipid-Metabolismus	BAE	1.7 ± 0.1	15
Homologe von Hitzeschockgenen aus der Genomsequenz						
SSO0862	559	Thermosom alpha UE	CCT-Tric Familie der Chaperonine	(B)AE	10.4 ± 1.4	30
SSO0282	557	Thermosom beta UE	CCT-Tric Familie der Chaperonine	(B)AE	5.0 ± 1.5	30
SSO3000	539	Thermosom gamma UE	CCT-Tric Familie der Chaperonine	(B)AE	0.4 ± 0.1	30
SSO2427	176	Hsp 20-1	Chaperon, alpha-Crystallin-Typ Hitzeschockprotein	BAE	2.5 ± 0.3	30
SSO2603	124	Hsp 20-2	Chaperon, alpha-Crystallin-Typ Hitzeschockprotein	BAE	2.2 ± 0.2	30
SSO2612	297	HtrA Serin-Protease (DegP)	Chaperon und Protease	BAE	5.4 ± 2.1	30
SSO1859	311	HtpX-verwandtes Hitzeschockprotein	Metalloprotease, 3 Homologe in Sso ⁴	BA	2.6 ± 0.4	5
SSO0730	126	Prefoldin/GimC	Chaperon, nur beta UE Homolog in Sso ⁴	AE	1.8 ± 0.2	5
Homologe Gene basaler Transkriptionsfaktoren						
SSO0446	309	TFB-1	TFIIB Homolog	AE	1.9 ± 0.6	15
SSO0946	293	TFB-2	TFIIB Homolog	AE	0.3 ± 0.1	30
SSO2450	476	TBP	TATA-Bindeprotein	AE	0.5 ± 0.1	30

¹: Vorkommen homologer Gene innerhalb der drei Domänen Bacteria (B), Archaea (A), Eukarya (E)

²: Mittelwerte der maximalen Hitzeschockinduktion, die mit quantitativer PCR und genpezifischen Primern ermittelt wurden (N=3)

³: Maximale Zu- oder Abnahme der mRNA-Menge, die entweder nach 5, 15 oder 30 Minuten bei einem Hitzeschock von 88°C bestimmt wurde

⁴: Sso: *Sulfolobus solfataricus*; Sto: *Sulfolobus tokodaii*

5.6 Identifizierung von Transkriptionsstarts und Promotoranalysen

Zur Bestimmung der Promotorregionen der neu identifizierten Hitzeschockgene wurden die Transkriptionsstarts mit der *primer extension* Methode ermittelt. Hierfür wurden 20 bis 30 Nukleotide lange Primer verwendet, die innerhalb der ersten 100 Basen stromab des Startcodons revers zur mRNA komplementär waren. Es wurde ein Protokoll entwickelt, bei dem die Markierung des verlängerten Stranges durch das Nukleotid (α - ^{35}S)dATP erfolgte, anstatt durch einen 5'- ^{32}P -markierten Primer. Der Vorteil dieser Art der Markierung lag darin, dass jedes beliebige Oligonukleotid eingesetzt werden konnte, ohne dass vorher ein enzymatischer Schritt zur ^{32}P -Endmarkierung durchgeführt werden musste.

Die Etablierung der optimalen Reaktionsbedingungen erfolgte anhand des Transkriptes von *tf55alpha*. Dabei wurde hauptsächlich der Einfluss der dNTP-Konzentration getestet, um das optimale Verhältnis von radioaktivem (α - ^{35}S)dATP zu nicht-radioaktiven Nukleotiden für die Strangmarkierung zu ermitteln. Hierfür wurde ein 30 Nukleotide langer Primer verwendet, der mit der Gesamt-RNA aus ungestressten und Hitzeschock-behandelten *S. solfataricus*-Zellen hybridisiert wurde.

Nach elektrophoretischer Auftrennung der Reaktionen und Detektion im Autoradiogramm wurde bei Verwendung von 20 μM dNTPs ein spezifisches Verlängerungsprodukt mit einer Länge von 149 Nukleotiden sichtbar (Abb. 14). In Anwesenheit von 500 und 200 μM dNTPs nahm der Anteil von unspezifischem Hintergrund stark zu, welcher auch mit Actinomycin D nicht unterdrückt werden konnte. Dabei waren die dNTP-Konzentrationen zu hoch, um eine effektive Markierung mit ^{35}S -dATP zu ermöglichen. Bei Verwendung von 2 μM dNTPs wurde ebenfalls ein Verlängerungsprodukt von 149 Nukleotiden sichtbar, jedoch zeigten sich aufgrund des dNTP-Verbrauchs verstärkt Kettenabbrüche.

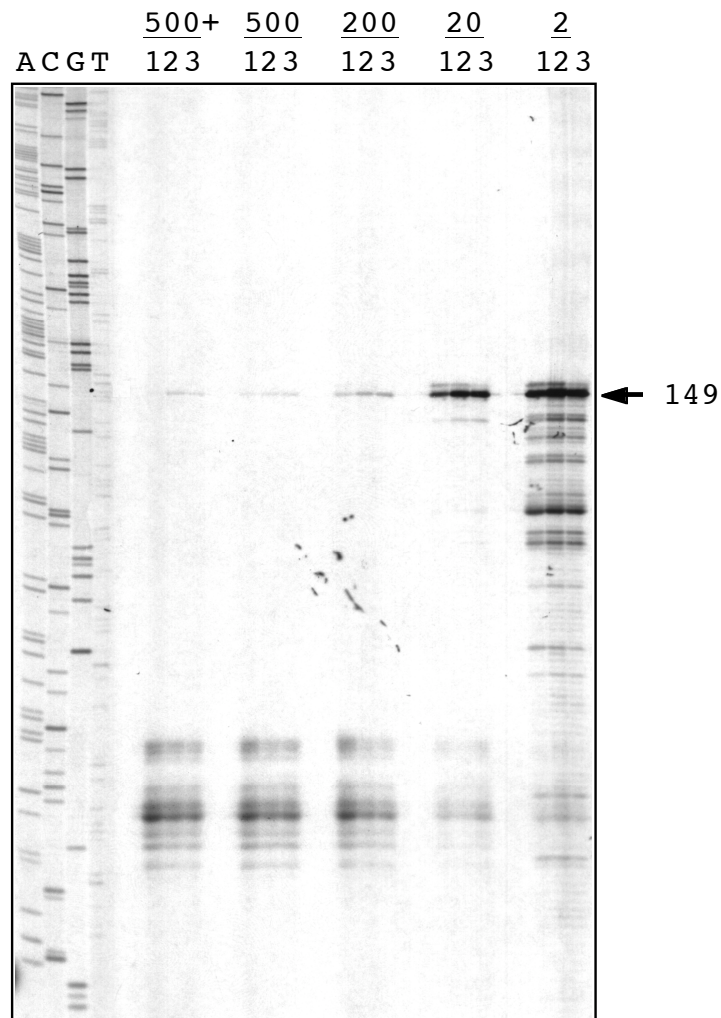


Abbildung 14: Autoradiogramm einer *primer extension*-Analyse von TF55alpha aus *S. solfataricus*. Die Spuren 1, 2, 3 entsprechen 0, 30, 60 Minuten Hitzeschock bei 88°C. Es wurden verschiedene dNTP-Konzentrationen getestet (unterstrichene Zahlen in μM), z.T. mit Actinomycin D (+). Das längste cDNA-Fragment betrug 149 Nukleotide. Eine Sequenzreaktion von ISC1439 (ACGT) diente als Grössenmarker.

Der Transkriptionsstart von TF55alpha wurde 18 Nukleotide stromauf vom Translationsstart bestimmt. Weitere 26 Nukleotide stromauf konnte eine TATA-Box identifiziert werden (Abb. 15).

Ebenso wurde der Transkriptionsstart des für die Thermosom beta Untereinheit codierenden Gens, sowie für weitere induzierte Gene bestimmt (Abb. 15). Zum besseren Vergleich der Promotorregionen wurden diese anhand der TATA-Boxen und BRE-Elemente in einem Sequenzalignment ausgerichtet. Diese Promotorelemente befanden sich 21 bis 26 Nukleotide stromauf vom Transkriptionsstart und folgten

dem archaealen Konsensus. Mit Ausnahme von SSO1474 hatten alle Transkripte zwischen Transkriptions- und Translationsstart eine nicht-translatierte Leitsequenz, die zwischen 14 und 18 Nukleotide lang war. Bei der Suche nach zusätzlichen, konservierten Sequenzen wurde eine 6 bis 10 Nukleotide lange, invertierte Sequenzwiederholung zwischen Promotor und Transkriptionsstart bei sechs Genen identifiziert (Abb. 15, Pfeile). Vor der *tf55alpha* Transkriptregion war an dieser Position nur eine 4 Nukleotide lange AT-reiche Sequenz zu erkennen. Eine weitere AT-reiche Region war direkt stromab der TATA-Box benachbart oder innerhalb dieser vorhanden. Stromauf der Promotorelemente von den meisten Genen wurden weitere, jedoch schwächer konservierte Regionen identifiziert.

Weiterhin wurden die Regionen stromauf vom Translationsstart auf palindromische Sequenzen hin überprüft (Abb. 16). Die Gene für die Thermosom Untereinheiten alpha und beta wiesen ein AT-reiches Palindrom innerhalb der Promotorelemente und ein weiteres bei ca. -100 auf, welches bei der beta Untereinheit weniger deutlich war. Mit Ausnahme von SSO1119 wurden auch bei den anderen ORFs palindromische Sequenzen gefunden. Diese zeichneten sich durch unterschiedliche Längen und Positionen aus. Meist handelte es sich dabei um AT-reiche Sequenzen, die jedoch keine sichtbaren Konservierungen zeigten. Bei SSO1469 konnte kein Palindrom identifiziert werden, statt dessen wurde stromauf und im Promotor eine perfekte Sequenzwiederholung von 9 Nukleotiden ermittelt.

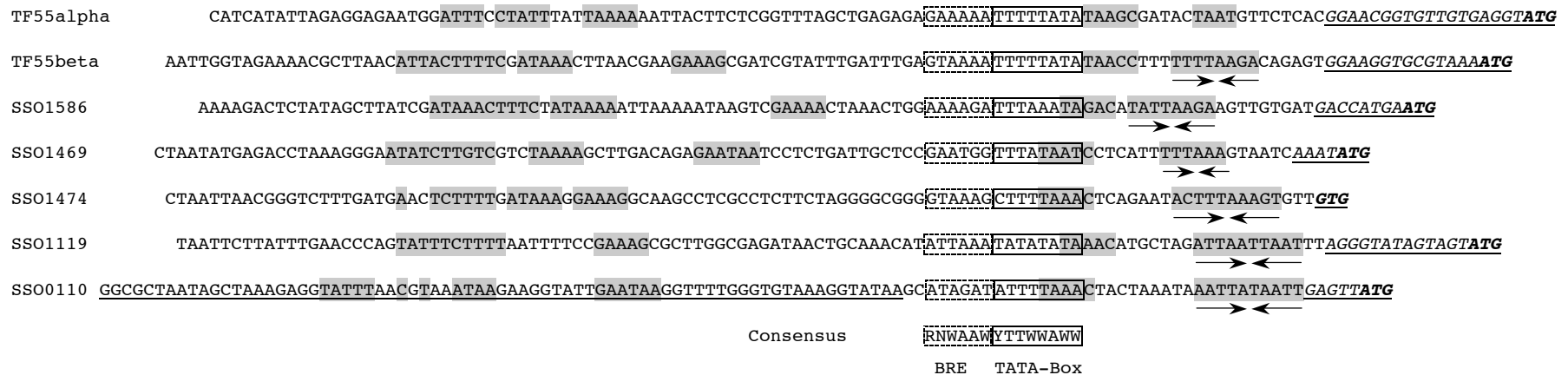


Abbildung 15: Vergleich der mit *primer extension* ermittelten Promotorregionen Hitzeschock-induzierter ORFs aus *S. solfataricus*. Die transkribierte Region ist kursiv und unterstrichen, der Translationsstart ist fett dargestellt. Die TATA-Box sowie das BRE-Element der Promotoren sind untereinander geschrieben und eingerahmt. Die beiden Konsensussequenzen sind darunter angegeben (Bell *et al.*, 1999). Graue Schattierungen zeigen kurze, konservierte Bereiche. Pfeile markieren eine kurze A/T-reiche invertierte Sequenzwiederholung, die zwischen Promotor und Transkriptionsstart identifiziert wurde. Unterstrichen (nicht kursiv) ist ein stromauf benachbarter ORF, der kurz vor dem Promotor von SSO0110 endet.

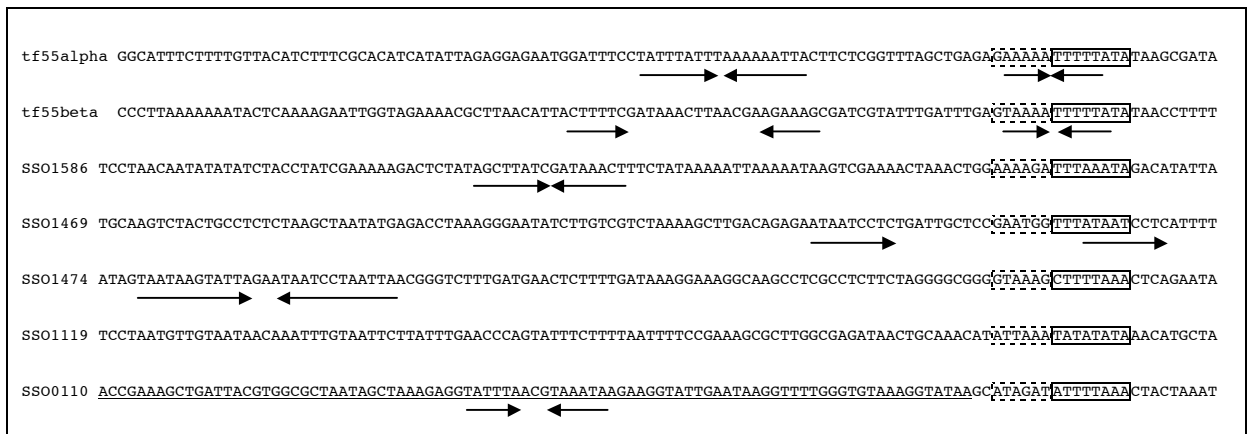


Abbildung 16: Identifizierte Palindrome und Sequenzwiederholungen (Pfeile) stromauf der Transkriptionsstartstellen. Die Sequenzen wurden an den TATA-Boxen (eingerahmt) zentriert. Das Ende eines sich stromauf von SSO0110 befindenden ORFs ist unterstrichen.

6. Diskussion

Die Hitzeschockreaktion und die daran beteiligten Gene und Proteine sind in hyperthermophilen Archaea noch weitgehend unerforscht. Bislang gab es nur einige wenige Studien, die hauptsächlich auf bioinformatischen Analysen homologer Hitzeschockgene einzelner Archaea basierten. Erst parallel zu dieser Arbeit wurden erste Untersuchungen veröffentlicht, die den Hitzeschock in dem hyperthermophilen Euryarchaeot *Pyrococcus furiosus* beinhalteten (Laksanalamai *et al.*, 2001; Vierke *et al.*, 2003; Shockley *et al.*, 2003). Für das zweite Königreich der Archaea, die Crenarchaeota, ist weiterhin noch nichts bekannt. Daher gibt diese Arbeit einen ersten Einblick in die globale Hitzeschockreaktion hyperthermophiler Crenarchaeota.

6.1. Hitzeschock und Thermotoleranz von *Sulfolobus solfataricus*

Studien an *Sulfolobus shibatae* haben gezeigt, dass die Zellen lethale Temperaturen von 92°C vermehrt tolerierten, wenn sie vorher sublethalen Temperaturen von 88°C ausgesetzt worden waren (Trent *et al.*, 1990). Dabei erhöhte sich die Anzahl der bei 92°C überlebenden Zellen um das 6-fache, wenn die Kultur mindestens 60 Minuten bei 88°C vorinkubiert wurde. Dieser Effekt, auch erworbene Thermotoleranz genannt, hielt bis zu 2 Stunden an, bevor die Zellen anfangen, rapide abzusterben. Wie auch in anderen Organismen werden während der Thermoadaptation von *Sulfolobus* bei 88°C vermehrt Hitzeschockproteine (HSPs) gebildet, die den Zellen ein besseres Überleben bei 92°C im Vergleich mit nicht hitzeadaptierten Zellen ermöglichen. Das Thermosom macht den grössten Anteil der unter diesen Bedingungen gebildeten HSPs aus. Die mRNA der alpha und beta Untereinheit wird bereits 15 Minuten nach Beginn des Hitzeschocks bei 88°C induziert (Trent *et al.*, 1991; Kagawa *et al.*, 1995). Andere Hitzeschockproteine sind soweit in *Sulfolobus* oder in anderen Crenarchaeota nicht experimentell identifiziert worden.

Da *S. solfataricus* mit 80°C ein höheres Temperaturoptimum als *S. shibatae* mit 75°C besitzt, wurde zu Beginn der Hitzeschockstudien untersucht, unter welchen

Bedingungen der „heissere Bruder“ eine Thermotoleranz erwirbt. Zunächst wurden Vorkulturen bei etwas geringeren Temperaturen von 78°C angelegt, um vorzeitigen Hitzestress durch eventuelle Temperaturschwankungen im Schüttelinkubator zu vermeiden. Für die Hitzeadaptation bei 88°C wurden unterschiedliche Inkubationszeiten von 60 und 120 Minuten untersucht. Im Idealfall sollte in den Flüssigkulturen eine Hitzeschockantwort ausgelöst werden, die Zellen sollten dabei aber nicht absterben. Nach 120 Minuten bei 88°C sank aber die Anzahl der überlebenden Zellen und damit die der auf Platte gewachsenen Kolonien auf 10-30% im Vergleich mit nicht-gestressten Zellen bei 78°C. Dagegen wirkten sich 60 Minuten bei 88°C nicht negativ auf das Überleben der Zellen aus.

Weiterhin wurde untersucht, welchen Hitzeschocktemperaturen die *S. solfataricus* Kulturen ausgesetzt werden müssen, um einen deutlichen Unterschied in der Anzahl der überlebenden Zellen zwischen voradaptierten und nicht-adaptierten Zellen feststellen zu können. Daher wurden die Zellen, mit und ohne vorheriger Inkubation bei 88°C, Temperaturen von 94, 95 und 96°C ausgesetzt und nach 120 und 240 Minuten wurden Proben entnommen. Ein eindeutiges Ergebnis zeigte sich bei einem Hitzeschock von 96°C, wobei nach 120 Minuten 10³-fach und nach 240 Minuten sogar 10⁴-fach mehr Zellen überlebten, wenn die Kulturen vorher bei 88°C vorinkubiert wurden. Ein Verlust von Zellen war trotz Voradaptation zu beobachten. So sank der Anteil der überlebenden Zellen nach den Hitzeschockinkubationen von 88°C/60min und 96°C/120min auf 20%, nach 88°C/60min und 96°C/240min sogar auf 2%. Das deutete darauf hin, dass die Zellen trotz protektiver Hitzeschockproteine zelluläre Schäden erleiden, die nur bedingt kompensiert werden können.

Die getesteten Temperaturen von 94 und 95°C erwiesen sich als nicht ausreichend, um einen eindeutigen Unterschied zwischen voradaptierten und nicht-adaptierten Zellen nach Hitzeschock hervorzubringen. Dabei war das Temperaturfenster sehr eng, das über das Überleben und Sterben der Zellen entschied. Geringfügige Schwankungen über 96°C hinaus, verursachten in einigen Experimenten einen sofortigen Zelltod.

Im Vergleich mit *S. shibatae* mussten bei *S. solfataricus* wesentlich höhere Temperaturen verwendet werden, um einen Effekt der Thermotoleranz bei lethalen

Temperaturen zu erzielen. Dagegen waren bei beiden *Sulfolobus* Spezies 88°C ausreichend für eine Thermoadaptation.

6.2. Transkription des Thermosoms nach Hitzeschock

In Northern-Analysen wurde mit einer *tf55alpha*-spezifischen RNA-Sonde die Induktion des Thermosomgens bei 88°C untersucht. Hierfür wurde Gesamt-RNA aus ungestressten und Hitzeschock-behandelten Kulturen der beiden Stämme *S. solfataricus* P1 und P2 verwendet. Im Stamm P1 konnte ein spezifisches *tf55alpha*-Transkript nachgewiesen werden, das nach 30 Minuten Hitzeschock bei 88°C zwischen vier- und achtfach verstärkt war. Sowohl höhere Hitzeschocktemperaturen von 90 und 92°C als auch längere Inkubationszeiten bis zu 60 Minuten hatten ähnliche Auswirkungen auf die Induktionsstärke.

Im Stamm P2 wurde zwar ebenfalls ein spezifisches *tf55alpha*-Transkript nachgewiesen, jedoch war keine Induktion nach Hitzeschock zu beobachten. Möglicherweise ist der Stamm im Laufe der Kultivierung im Labor degeneriert, d.h. es liegt eine Mutation vor, die die Induktion des Thermosomgens nicht mehr erlaubt. Das scheint nicht unwahrscheinlich, da im *S. solfataricus* Genom mindestens vier verschiedene Insertionselemente aktiv sind, die in 10 bis 24 Kopien vorkommen und hohe Mutationsfrequenzen verursachen (Martusewitsch *et al.*, 2000). Eine andere Möglichkeit ist, dass für die Induktion von Hitzeschockproteinen im Stamm P2 geringfügig höhere Temperaturen als 88°C erforderlich sind als in P1. Dies erscheint aber aufgrund der sehr nahen genetischen Verwandtschaft der beiden Stämme als unwahrscheinlich. Ausserdem waren beide Stämme in der Lage, bei 88°C eine Thermotoleranz zu erwerben. Das könnte darauf hindeuten, dass eventuell andere Hitzeschockproteine an dem Prozess der Thermoadaptation beteiligt sind. Es ist ausserdem bekannt, dass sich abhängig von der Wachstumstemperatur die Zusammensetzung der TF55-Untereinheiten ändert (Kagawa *et al.*, 2003), was vermuten lassen könnte, dass die anderen beiden Untereinheiten die fehlende Induzierbarkeit der alpha-Untereinheit kompensieren.

Aufgrund dieser Resultate wurde für die Identifizierung weiterer Hitzeschockgene der Stamm P1 verwendet.

In einer Dot-Blot-Analyse wurde die Induktion des Gens für die Thermosom alpha Untereinheit über einen Zeitverlauf von 5, 15 und 30 Minuten nach Hitzeschock untersucht. Dabei wurde eine Zunahme der Transkriptmengen schon nach 5 Minuten bei 88°C festgestellt, die nach 30 Minuten maximal war. Aus Studien an *S. shibatae* war bereits bekannt, dass in diesem Organismus die Induktion der *tf55*-Transkripte nach 15 Minuten maximal war und auch noch nach 30 Minuten konstant blieb, wobei eine geringfügige Abnahme der mRNA nach 45 Minuten beobachtet wurde (Kagawa *et al.*, 1995).

6.3. Identifizierung differentiell exprimierter Gene nach Hitzeschock

Verständnis über die Regulation der Genexpression der Zellen zu erlangen, ist eines der grössten Interessen der molekularen Biologie. Zu den klassischen Methoden, Transkripte aus unterschiedlichen Zelltypen oder aus Kulturen, die unter verschiedenen Bedingungen kultiviert wurden, zu identifizieren, gehören beispielsweise die differentielle Hybridisierung und die Subtraktionshybridisierung (nachzulesen bei Lottspeich & Zorbas, 1998). Der Nachteil dieser Methoden ist jedoch, dass sie sehr zeitaufwendig sind und dass grosse RNA-Mengen benötigt werden. Liang und Pardee haben Anfang der 1990er Jahre eine PCR-Technik entwickelt, die theoretisch die Detektion jeder exprimierten mRNA einer Zelle in einem Gel möglich macht (Liang & Pardee, 1992). Dabei findet zunächst eine reverse Transkription (RT) der mRNA in cDNA und anschliessend eine Amplifizierung durch PCR unter Verwendung geeigneter Zufallsprimer statt, die im Idealfall jedes Transkript einer mRNA-Population erfassen. Ein grosser Vorteil dieser Methode, die DDRT-PCR (*differential display RT-PCR*), kurz DD-PCR, oder auch RAP-PCR (*RNA arbitrarily primed PCR*) genannt wird, im Vergleich mit der differentiellen und subtraktiven Hybridisierung ist, dass aufgrund des Amplifikationsschrittes in der PCR nur geringe Mengen RNA als Ausgangsmaterial benötigt werden. Dadurch ist die

Nachweisempfindlichkeit sehr gross und die Detektion sehr seltener Transkripte ist möglich.

In ihrem grössten Vorteil liegt jedoch auch der grösste Schwachpunkt dieser Methode, da aufgrund der hohen Sensitivität kleinste Variationen der experimentellen Bedingungen zu unterschiedlichen Resultaten führen können. Somit können bis zu 40% der scheinbar induzierten Transkripte falsch positiv sein (Lottspeich & Zorbas, 1998). Daher wird allgemein empfohlen, eine bestimmte DD-PCR-Reaktion mehrmals zu wiederholen, bevor eine Aussage über die Gültigkeit eines Expressionsmusters gemacht werden kann.

Mitterweile hat sich eine neuere Methoden zur Analyse von Expressionsmustern einer Zelle etabliert, der *DNA-Chip* oder *DNA-Microarray* (<http://www.gene-chips.com>). Hierbei wird maschinell und auf kleinster Fläche DNA auf einen Träger (Glas oder Nylonsubstrate) aufgebracht, und zur Hybridisierung von mRNA oder cDNA verwendet. Voraussetzung für die Herstellung der DNA-Chips oder Microarrays ist, dass die Genomsequenz des entsprechenden Organismus bekannt ist, denn mit dieser Technologie wird die Gesamtheit aller Transkripte einer Zelle gleichzeitig analysiert. Diese Technik ist jedoch sehr kostenaufwendig und benötigt eine spezielle Laborausstattung sowohl für die Synthese als auch für die Auswertung des DNA-Chips.

Zu Beginn dieser Promotionsarbeit war zwar die Genomsequenz von *S. solfataricus* bekannt, es stand jedoch kein DNA-Chip für Transkriptionsanalysen zur Verfügung. Daher wurde die DD-PCR als anwendbare Alternative betrachtet und für Hitzeschockstudien an *S. solfataricus* etabliert.

a) Hitzeschock und cDNA-Synthese

Für die Identifizierung von Hitzeschockproteinen aus *S. solfataricus* wurden Kulturen vom Stamm P1 verwendet, die vorher einem Hitzeschock bei 88°C über eine Zeitdauer von 0, 5, 15 und 30 Minuten ausgesetzt worden waren. Nach der Isolierung der Gesamt-RNA aus den Kulturen wurde daraus zunächst cDNA synthetisiert. In Eukaryoten werden hierfür Poly(dT)-Oligos verwendet, die spezifisch am Poly(A)-Schwanz der mRNA binden. So wird vorwiegend mRNA, nicht aber rRNA und tRNA revers transkribiert. Da die mRNA von Prokaryoten meist keine Poly(A)-

Anhänge trägt, wird bei der reversen Transkription eine Mischung aus hexameren Primern mit zufälliger Sequenz verwendet. Diese besitzen eine statistische Wahrscheinlichkeit an jeder RNA zu binden, so dass neben mRNA auch andere RNAs umgeschrieben werden. Da die stabilen RNAs (tRNA, rRNA) einen grossen Anteil der Gesamt-RNA in einer Zelle ausmachen, würden diese bei der reversen Transkription gegenüber der mRNA dominieren. Die proteincodierenden Regionen in *Sulfolobus* besitzen im Gegensatz zu den stabilen RNAs (55-60 mol%) einen niedrigen G+C-Gehalt von 33-38 mol%. Daher wurden für die cDNA-Synthese Hexamere mit niedrigem G+C-Gehalt (25 mol%) verwendet, um bei der reversen Transkription gegenüber den stabilen RNAs zu diskriminieren.

b) Auswahl der Primer für DD-PCR

Die Wahl der Primer für die DD-PCR ist ein kritischer Schritt, der darüber entscheidet, ob und wieviele cDNA-Fragmente amplifiziert werden. Die Primer sollten möglichst häufig mit der cDNA hybridisieren, jedoch darf die Anzahl der amplifizierten Fragmente nicht zu hoch sein, damit sie sich noch gut in einer Elektrophorese auflösen lassen. Andererseits dürfen nicht zu wenige PCR-Fragmente entstehen, um eine möglichst repräsentative Anzahl von Hitzeschocktranskripten erfassen zu können. Zu diesem Zweck wurden am NRC in Halifax/Kanada anhand der vorhandenen Genomdaten kurze, oligomere Sequenzen identifiziert, die am häufigsten in codierenden Regionen, nicht aber in repetitiven Elementen vorkommen. Daraus wurden Primer für die DD-PCR abgeleitet, die aus 10, 14, 16 und 18 Nukleotiden bestanden. Da sich die kurzen Wiederholungen innerhalb der offenen Leserahmen befanden und einen niedrigen G+C-Gehalt hatten, wurde mit der Primerwahl erneut gegenüber stabilen RNAs diskriminiert. Die einzelnen Wiederholungssequenzen wurden mit einer Häufigkeit von maximal 40 (10-mere) bzw. 10 Kopien (14-, 16-, 18-mere) gefunden, was zunächst nicht sehr häufig zu sein schien. Jedoch unterschieden sich viele der Sequenzen nur an wenigen Positionen, so dass durch unstringente PCR-Bedingungen Fehlpaarung und Hybridisierung an möglichst vielen cDNAs ermöglicht wurden. Aus den am häufigsten vorkommenden Wiederholungssequenzen wurden 20 als Primer für die DD-PCR ausgewählt,

bevorzugt mit internen Start- und Stop-Codons. Eine ähnliche Strategie wurde bereits für die DD-PCR in *E.coli* angewendet, indem Primer aus 10 Nukleotiden anhand wiederholt vorkommender Sequenzen innerhalb codierender Regionen abgeleitet wurden, und daraus die häufigsten mit Start- und Stop-Codons ausgewählt wurden (Fislage *et al.*, 1997). Zu Beginn der hier vorgestellten Studien zeigte sich jedoch, dass sich 10-mere Oligonukleotide aufgrund ihres niedrigen G+C-Gehalts nicht für den Einsatz in PCR-Reaktionen in *Sulfolobus* eigneten. Daher wurden vier 10-mere zu zwei 20-meren verbunden und stattdessen für die DD-PCR verwendet.

c) DD-PCR

Bei der Etablierung der DD-PCR für *Sulfolobus* wurden in erster Linie die Primer, sowie die dNTP- und $MgCl_2$ - Konzentrationen variiert. Dabei zeigte sich, dass sich niedrige $MgCl_2$ -Konzentrationen (1,5 mM) positiv auf die Unterdrückung von unspezifischem Hintergrund auswirkten und dabei nicht zu stringente Reaktionsbedingungen verursachten, so dass noch ausreichend cDNA-Fragmente gebildet wurden. Ausserdem waren geringe dNTP-Konzentrationen (2 μM) für eine gute Markierung der amplifizierten cDNA-Fragmente mit (α - ^{35}S)dATP erforderlich. Beim Einsatz höherer Konzentrationen an dNTPs von bis zu 200 μM wurden durch den grösseren Anteil von dATP die PCR-Produkte nicht ausreichend mit dem radioaktiven Nukleotid markiert. Allerdings können zu geringe dNTP-Mengen zu vorzeitigen PCR-Abbrüchen führen, da die Nukleotide schnell aufgebraucht werden. Dies könnte ein Problem bei der Amplifikation seltener cDNAs darstellen, die eine bestimmte Menge erreichen müssen, um überhaupt nachgewiesen werden zu können.

Bei den verwendeten 10 Primerkombinationen aus 20 Oligonukleotiden erwiesen sich besonders 16- und 18-mere als geeignet. 21 von 24 der in Tabelle 7 dargestellten isolierten cDNA-Fragmente wurden mit diesen Primern amplifiziert. Sie lieferten hauptsächlich PCR-Produkte im Bereich zwischen 100 und 500 Nukleotiden, was bei der Auftrennung im Gel und bei der späteren Isolierung vorteilhaft war (siehe Abb. 7A). Bei Verwendung von 14-meren wurden in der DD-PCR v.a. viele lange cDNA-Fragmente gebildet. 10-mere Primer lieferten dagegen keine Produkte in der DD-PCR, da sie wahrscheinlich zu kurz waren und einen zu geringen G+C-Gehalt hatten, um mit der cDNA während der PCR-Reaktion hybridisieren zu können.

Ein Nachteil der Strategie, die Oligonukleotide aus repetitiven Sequenzen von Genen abzuleiten, war, dass bestimmte Transkripte präferiert und besonders häufig amplifiziert würden. Bei der Sequenzanalyse der isolierten cDNA-Fragmente stellte sich aber heraus, dass die Primer immer mit einigen Fehlpaarungen hybridisiert hatten, was mit der geringen Stringenz in der DD-PCR auch beabsichtigt war. Hierbei wurde auch erkennbar, dass die Primer weder am Start- noch am Stop-Codon der cDNA hybridisiert hatten, sondern an zufälligen Positionen.

Die meisten der mit DD-PCR amplifizierten cDNA-Fragmente zeigten im Autoradiogramm keine Veränderungen der Mengen nach Hitzeschock. Zum einen konnten das Amplifikate von mRNAs sein, deren Transkription durch Hitzeschock nicht beeinflusst wird, zum anderen konnten die PCR-Produkte schon in der Sättigung liegen. Daher wurde auch ein Fragment untersucht, dessen Menge sich unter Hitzeschock nicht veränderte (Tab. 7, SSO2874). In der späteren Quantifizierung der mRNA-Mengen stellte sich heraus, dass die mRNA-Mengen dieses Gens unter Hitzeschock leicht zunahmen und mit 1,7-fach in einem Bereich lagen, wie es auch für andere identifizierte Gene gemessen wurde. Hier ist zwar bei nur einem Beispiel eine repräsentative Aussage nicht möglich, diese Beobachtung sollte aber bei der Beurteilung solcher scheinbar gleicher Muster nicht unberücksichtigt bleiben.

Unter den amplifizierten cDNA-Fragmenten mit zunehmenden Mengen nach Hitzeschock waren zwei verschiedene Muster erkennbar. Bei den meisten war die grösste Menge nach 30 Minuten Hitzeschock vorhanden (spätes Muster), einige zeigten aber ein frühes Induktionsmuster, das nach 5 bis 15 Minuten Hitzeschock maximal war und nach 30 Minuten wieder abnahm. Diese cDNA-Fragmente wurden später den Genen SSO0110, SSO1087, SSO1586 und SSO2701 zugeordnet (Tab. 7). Im Autoradiogramm waren auch solche Fragmente zu sehen, deren Mengen nach Hitzeschock abnahmen. Das liess entweder eine Repression der Transkription oder eine kürzere Lebensdauer der mRNA unter Hitzeschock vermuten. Solche Fragmente wurden in dieser Studie nicht näher analysiert.

d) Isolierung und Identifizierung von cDNA-Fragmenten

Für nähere Untersuchungen wurden 32 cDNA-Fragmente mit zunehmendem Muster ausgesucht, die in mindestens einer weiteren DD-PCR-Reaktion reproduziert werden konnten. Am Ende konnten die Sequenzen von 24 erfolgreich isolierten und klonierten cDNA-Fragmenten 18 verschiedenen ORFs aus der *S. solfataricus* Genom-Datenbank zugeordnet werden (Tab. 7). Darunter befanden sich drei Fragmente aus drei verschiedenen DD-PCR-Reaktionen, die zu einem Gen gehörten (SSO1752). Die Funktionen der zugeordneten Gene werden in einem späteren Abschnitt erläutert. Weiterhin wurden fünf Fragmente unterschiedlicher Längen mit drei verschiedenen Primerkombinationen erhalten, die als Thermosom alpha Untereinheit identifiziert wurden. Das häufige Vorkommen dieses Transkripts war nicht verwunderlich, da das Thermosom wahrscheinlich den grössten Anteil des Gesamtproteins unter Hitzeschockbedingungen ausmacht (Trent *et al.*, 1990; Kagawa *et al.*, 1995). Ausserdem stellte es eine interne Kontrolle für eine induzierte Hitzeschockantwort in *Sulfolobus* und für eine erfolgreiche DD-PCR dar. Die mRNA der beta Untereinheit des Thermosoms wurde dagegen mit DD-PCR nicht identifiziert. Auch Transkripte von Genen, die für Homologe von Hitzeschockproteinen codieren, und für die eine Induktion mittels qPCR nachgewiesen werden konnte (s. u.), wurden nicht in der DD-PCR detektiert. Dies deutet darauf hin, dass mit diesem DD-PCR-Ansatz nur ein kleiner Teil der differentiell exprimierten Hitzeschockgene identifiziert wurde. Um eine repräsentative, genomweite Expressionsanalyse Hitzeschock-induzierter Gene durchzuführen, müssten mehr Primerkombinationen untersucht werden. In *E. coli* waren 100 verschiedene Primerkombinationen notwendig, um mit insgesamt über 4000 cDNA-Fragmenten 90% der Transkripte des 4,7 Mbp grossen Genoms abzudecken (Fislage *et al.*, 1997). Dabei wurde davon ausgegangen, dass ein amplifiziertes Fragment ein Gen repräsentierte.

6.4. Quantifizierung von mRNA-Mengen nach Hitzeschock

Die Zunahme der relativen Transkriptmengen der 18 mit DD-PCR identifizierten Gene wurde mit quantitativer PCR bestimmt. Ausserdem wurden sowohl einige Homologe von Hitzeschockgenen als auch basale Transkriptionsfaktoren in diese Studie einbezogen, um einen umfassenden Einblick in die Hitzeschockantwort von *Sulfolobus* zu erhalten.

Da die angewandte PCR-Methode eine Endpunktbestimmung darstellte, wurde zu Beginn für jedes untersuchte Gen und jedes verwendete Primerpaar der exponentielle Bereich der PCR-Reaktion bestimmt. Die Primer wurden so gewählt, dass sie eine möglichst kurze Region (150-500 Basen) vom Ende (3'-Ende) der cDNA amplifizierten, da die Effizienz einer PCR negativ mit der Länge des amplifizierten Produktes korreliert. Hierfür wurde eine serielle Verdünnungsreihe der cDNA über eine konstante Zyklenzahl amplifiziert und nach elektrophoretischer Auftrennung wurde die Fluoreszenz der mit SYBR-Green angefärbten PCR-Produkte bestimmt. Die gemessenen Fluoreszenz wurden gegen die eingesetzten cDNA-Mengen graphisch aufgetragen und mittels linearer Regression wurde die Steigungsgleichung und das Bestimmtheitsmass R^2 bestimmt. Für die Quantifizierung der mRNA-Mengen nach 0, 5, 15 und 30 Minuten Hitzeschock wurden dann konstante Mengen cDNA verwendet, aber die Anzahl der Amplifizierungsschritte wurde entsprechend dem ermittelten exponentiellen Bereich der PCR-Reaktion angepasst. Die Fluoreszenz der PCR-Produkte aus cDNA 5, 15 und 30 Minuten nach Hitzeschock wurde durch die Fluoreszenz der cDNA ohne Hitzeschock dividiert und die relative Induktion wurde bestimmt (Abb. 11+12).

Innerhalb der neu identifizierten Hitzeschockgene wurde die höchste Induktion mit 10,4-fach für *tf55alpha* ermittelt. Das kam dem anhand von Northern-Analysen abgeschätzten Wert von bis zu 8-fach recht nah. Für die meisten der identifizierten Gene wurde eine moderate Induktion von 1,5- bis 3,1-fach ermittelt (Tab. 8, Abb. 11). Diese Gene werden im nächsten Abschnitt näher diskutiert. Drei Gene (SSO0569, SSO1087, SSO2241) wurden als nicht-induziert eingestuft, da die

Zunahme der Transkripte unterhalb 1,5-fach lag. Für die beiden ORFs SSO1752 und SSO2087 konnten mit qPCR keine mRNA-Mengen bestimmt werden.

Die Transkripte der Gene, die für homologe Hitzeschockproteine codieren, waren ebenfalls moderat erhöht und lagen zwischen 1,8- und 5,4-fach (Abb. 12, Tab. 8). Eventuell benötigen diese Gene eine längere Hitzeschockbehandlung zur stärkeren Induktion als es für *tf55* ermittelt wurde. Das Gen für die beta Untereinheit des Thermosoms war mit 5-fach nur halb so stark induziert wie das für die alpha Untereinheit. Dagegen nahmen die mRNA-Mengen von *tf55gamma* nach 30 Minuten auf 0,4-fach der Menge vor dem Hitzeschock ab. Die unterschiedlichen Induktionen der Gene für die einzelnen Thermosom Untereinheiten von *S. solfataricus* stimmten mit vorherigen Analysen überein, in denen bereits eine 2:1 Stöchiometrie von alpha zu beta für den kristallisierten Thermosom-Proteinkomplex beschrieben wurde (Ellis *et al.*, 1998). Ausserdem wurde für *S. shibatae* gezeigt, dass die Gene der drei Thermosom Untereinheiten unterschiedliche Expressionsmuster unter Hitze- und Kälteschock besitzen (Kagawa *et al.*, 2003). Während die Transkripte von *tf55alpha* und *tf55beta* unter Hitzeschock zunahmen, gingen die von *tf55gamma* zurück. Genau umgekehrt war die Situation bei einem Kälteschock bei 60°C, wobei *tf55gamma* induziert wurde. In *Pyrococcus furiosus*, wo das Thermosom aus nur einer Untereinheit besteht, wurde mit DNA-Microarrays eine ähnlich moderate Induktion (4-fach) bestimmt (Shockley *et al.*, 2003), wie in dieser Studie für *tf55beta* von *S. solfataricus*.

Eine 2,5- und 2,2-fache Zunahme wurde für die Gene der beiden Hsp20-Homologe in *S. solfataricus* gefunden. Transkriptionsstudien des Hsp20-Homologs in *P. furiosus* ergaben eine Hitzeschockinduktion von 7-fach, wobei das Gen unter optimalen Wachstumsbedingungen kaum transkribiert wurde (Laksanalamai *et al.*, 2001; Shockley *et al.*, 2003). In *S. solfataricus* wurden dagegen die beiden mRNAs auch im ungestressten Zustand gebildet.

Die Transkripte des Prefoldin-Gens waren in *S. solfataricus* nach Hitzeschock leicht erhöht (1,8-fach). In *P. furiosus* wurde dagegen eine Abnahme der mRNA von Prefoldin (beta Untereinheit) nach Hitzeschock gemessen. Jedoch verfügt *Pyrococcus* im Gegensatz zu *Sulfolobus* über zwei Prefoldin-Untereinheiten (alpha und beta), wobei keine Aussagen zur Induktion von Prefoldin-alpha gemacht wurden.

Das potentielle *htpX*-Gen war 2,6-fach nach Hitzeschock induziert. In der Genomsequenz von *S. solfataricus* sind drei HtpX-Homologe vorhanden. Die beiden anderen Gene wurden hier jedoch nicht analysiert. Studien an *Escherichia coli* haben HtpX als eine putative Metalloprotease in der Plasmamembran beschrieben, die nach Hitzeschock induziert wird und vermutlich an der Proteolyse anormaler und missgefalteter Membranproteine beteiligt ist (Kornitzer *et al.*, 1991; Shimohata *et al.*, 2002).

Eine signifikante Zunahme der mRNA-Mengen bis zu 5,4-fach nach Hitzeschock wurde für das *htrA*-Homolog festgestellt. Damit war es nach *tf55alpha* das am zweitstärksten induzierte Gen in *S. solfataricus*, welches mit qPCR quantifiziert wurde. HtrA homologe Gene sind in Pro- und Eukaryoten weit verbreitet. In *E. coli* ist HtrA ein peripheres, periplasmatisches Membranprotein, das vermutlich an der Degradation anormaler Proteine beteiligt ist (Übersicht bei Pallen & Wren, 1997). HtrA-Nullmutanten von *E. coli* sind thermotempersensitiv und besitzen eine erniedrigte Proteolyseaktivität im Periplasma.

Unter den homologen Genen basaler Transkriptionsfaktoren wurde eine Induktion für *tfb-1* ermittelt, wobei *tfb-2* unter den gleichen Hitzeschockbedingungen stark abnahm. Auch in *Haloferax volcanii* und *Pyrococcus furiosus* wurden bereits ähnliche Beobachtungen gemacht, wobei eins von insgesamt sechs *tfb*-Genen in *Haloferax* (Thompson *et al.*, 1999) und eins von zwei in *Pyrococcus* (Shockley *et al.*, 2003) nach Hitzeschock induziert wurden. Seitdem in Archaea mehrere TFB-Homologe in den Genomen identifiziert wurden, wird eine regulatorische Funktion ähnlich den *sigma*-Faktoren von Bakterien spekuliert. Diese Ergebnisse zusammen verstärken den Verdacht, dass der basale Transkriptionsapparat selbst an der Genregulation in Archaea beteiligt sein könnte.

Abnehmende mRNA-Mengen, wie sie für die Gene *tfb-2*, *tbp* und *tf55gamma* gemessen wurden, können entweder durch eine aktive Repression der Transkription oder durch verstärkten mRNA-Abbau nach Hitzeschock verursacht sein.

Die Induktion von Hitzeschockgenen scheint in Hyperthermophilen generell moderat zu sein. Diese Organismengruppe betreibt vielleicht aufgrund der Anpassung an hohe Wachstumstemperaturen eine Art feines „Tuning“ der Genexpression, um die

zellulären Funktionen nach Hitzeschock aufrecht zu erhalten. In Bakterien wurden dagegen, je nach Studie, sehr unterschiedliche Messungen für einzelne Hitzeschock-mRNAs erhalten. So wurde für das Hsp60-homologe *groEL* in *E. coli* mit Dot-Blot-Analysen eine 10-fache Induktion nach Hitzeschock festgestellt, mit DNA-Microarrays jedoch eine 40-fache (Richmond *et al.*, 1999). In *B. subtilis* wurde für *groEL* eine 7-fache Induktion ermittelt (Microarray; Helmann *et al.*, 2001). Bei der Untersuchung der Transkription von *htrA/degP* wurde in *E. coli* eine Zunahme von 31-fach (Northern Dot-Blot; Gill *et al.*, 1999), in *B. subtilis* von 4,9-fach (Microarray; Helmann *et al.*, 2001) ermittelt.

Diese Ergebnisse könnten darauf hinweisen, dass auch in Bakterien die Induktionen nicht generell höher als die in Hyperthermophilen sein müssen, sondern stark von der angewendeten Methode abhängen. Ein genaueres Bild wird man erst erhalten, wenn mehr Studien zur Hitzeschockantwort in hyperthermophilen Archaea vorliegen.

6.5. Mögliche Funktionen der neu identifizierten Hitzeschockgene in *Sulfolobus*

Mit Hilfe der *differential display* Methode und mittels quantitativer PCR wurden 13 verschiedene Gene identifiziert, die nach Hitzeschock bei 88°C in *S. solfataricus* induziert waren. Sieben dieser Gene bzw. ihrer Produkte konnte eine Funktion zugewiesen werden. Neben dem Gen für die alpha Untereinheit des Chaperonins TF55 (SSO0862) wurde ein Gen für eine putative Transposase (SSO1474) identifiziert, die in einer Kopie im *S. solfataricus* und in 7 Kopien im *S. tokodaii* Genom vorkommt. Diese könnte daher über horizontalen Gentransfer aus *S. tokodaii* aufgenommen worden sein. Ob die Transposase zu einem Insertionselement gehört, konnte nicht festgestellt werden, da keine invertierten Sequenzwiederholungen identifiziert werden konnten. Die Aminosäuresequenz zeigte Ähnlichkeiten mit bakteriellen Transposasen der IS200-Familie. Interessant war die Position des ORFs für die putative Transposase, welcher um 14 Basen mit einem weiteren ORF überlappte, der für eine Transposase des Insertionselements ISC1476 codiert. Vermutlich ist SSO1474 in den ORF für die Transposase von ISC1476 transponiert,

da ISC1476 in vier Kopien im Genom vorkommt aber nur einmal überlappend mit der Hitzeschock-aktivierten Transposase. In der Genomsequenz von *S. solfataricus* sind viele verschiedene Insertionselemente identifiziert worden (She *et al.*, 2001). Die Aktivität für einige dieser Elemente ist bereits untersucht worden (Schleper *et al.*, 1994; Martusewitsch *et al.*, 2000), jedoch noch nicht unter Hitzeschockbedingungen. In *Lactobacillus* wurde bereits beobachtet, dass Hitzeschock die Transposition von mobilen Elementen induzieren kann (Stroman *et al.*, 2003).

In *Sulfolobus* waren auch solche Gene induziert, die an diversen physiologischen Prozessen beteiligt sind (SSO1135, SSO1207, SSO2018, SSO2701, SSO2874). Dabei stellt sich die allgemeine Frage, warum solche Gene unter Hitzeschock induziert sein sollten. Ein Hitzeschock von 88°C hatte kaum lethale Auswirkungen für den Organismus. Die Zellen stellten zwar ihre Teilung ein, konnten diese Temperaturen jedoch eine Weile tolerieren. Daher müssen die physiologischen Prozesse mindestens aufrecht erhalten, wenn nicht sogar angekurbelt werden, um die negativen Auswirkungen des Hitzestress zu kompensieren. Das könnte sich z.B. in kürzeren Halbwertszeiten der Transkripte und Proteine äussern, oder auch zum thermischen Verfall von ATP, Zuckern und anderen Molekülen führen. Daher müssten die Zellen ihre Stoffwechselreaktionen beschleunigen, wofür die Induktion der Synthese von RNA und Proteinen erforderlich wäre. So konnte bereits gezeigt werden, dass Hitzeschock zu einem ansteigenden ATP-Bedarf und deshalb zur verstärkter Glykolyse führen kann (Nickells & Browder, 1988).

Der Glucose-Metabolismus in *Sulfolobus* läuft über einen modifizierten Entner-Doudoroff Weg ab, wobei Pyruvat und Glycerinaldehyd die Endprodukte sind (DeRosa *et al.*, 1984). Analog würde sich, entsprechend der oben dargestellten Theorie, Pyruvat aufgrund eines erhöhten ATP-Bedarfs bei Hitzeschock in der Zelle anhäufen. Dadurch könnte sich die leichte Induktion von SSO1207 nach Hitzeschock erklären lassen, da das Gen für die alpha Untereinheit einer Pyruvat-Synthase, eine Ferredoxin-Oxidoreduktase, codiert. Dieses Enzym katalysiert die oxidative Decarboxylierung von Pyruvat zu Acetyl-CoA und CO₂. Der ORF SSO1207 befindet sich in einem Gencluster mit den beiden ORFs für die beta und gamma Untereinheit.

Daher wäre es interessant, die Transkription dieser Gene ebenfalls nach Hitzeschock zu analysieren.

Ein erhöhter Glucose-Metabolismus erfordert auch einen verstärkten Transport der Kohlenstoffquellen in die Zelle. Ein an solchen Transportfunktionen beteiligtes Protein codiert SSO2701, das ein Homolog von Protonen/Zucker-Transportern darstellt. Dieses homologe Gen von Permeasen der *Major Facilitator Superfamily* war 2,5-fach nach Hitzeschock induziert.

Mit SSO2018 wurde ein Gen identifiziert, das homolog zu einem am aeroben Aromatenabbau beteiligten Proteingen (PaaA/PhaF) von Bakterien ist. Dieses Gen ist mit weiteren ORFs in einem Gencluster angeordnet, die ebenfalls Proteingenen homolog sind, die in diesem Abbauweg vorkommen. Die Funktion dieser Gene ist in *Sulfolobus* völlig unbekannt. Um so erstaunlicher ist, dass SSO2018 unter Hitzeschock leicht induziert war. Vielleicht verwendet *Sulfolobus* dieses Genprodukt, um aromatische Verbindungen zu verwerten, die sich nach Hitzeschock intrazellulär anhäufen, wie z.B. aromatische Aminosäuren hitzedenaturierter und proteolytisch abgebauter Proteine.

Das von SSO1135 codierte Protein ist mit Heterodisulfid-Reduktasen verwandt, die charakteristische Enzyme beim Elektronentransport und Energiemetabolismus in methanogenen Archaea darstellen. Homologe dieser Proteine wurden auch in vielen Prokaryoten identifiziert, die keine Methanogenese betreiben (Hedderich *et al.*, 1998). Ihre Funktion ist hier völlig unbekannt. Anhand einer Studie in dem extrem thermophilen Archaeon *Archaeoglobus fulgidus* wurden erste Hinweise darauf erhalten, dass diese homologen Proteine auch in nicht methanogenen Archaea am Elektronentransport beteiligt sein könnten (Mander *et al.*, 2002).

In *Sulfolobus* ist ein Thiolase-verwandtes Gen (SSO2874) leicht induziert, welches dem Lipid-Metabolismus zugeteilt wird. Analysen der Zellmembran des hyperthermophilen Bakteriums *Thermotoga maritima* haben ergeben, dass der Organismus die Zusammensetzung seiner Lipide abhängig von der Wachstumstemperatur moduliert (De Rosa *et al.*, 1989). Möglicherweise deutet das Thiolase-Homolog auf einen ähnlichen Adaptionsmechanismus in *Sulfolobus* hin.

Diese Beobachtungen und Vermutungen könnten darauf hindeuten, dass in *Sulfolobus* alle oder viele Stoffwechselwege unter Hitzeschock verstärkt arbeiten. Die

Auswirkungen des Hitzeschocks auf physiologische Prozesse und auf die daran beteiligten Gene und Proteine wurden bisher kaum analysiert. Hier bedarf es weiterer Studien, um einen umfangreichen Einblick in diese Prozesse zu erhalten.

Sieben der identifizierten Hitzeschockgene haben keine bisher bekannten Funktionen (hypothetisch oder konserviert hypothetisch). Sie kommen nur in den Archaea bzw. nur in *S. solfataricus* und *S. tokodaii* vor. Bei drei von diesen ORFs (SSO1752, SSO1256, SSO1469) zeigte sich, dass sie miteinander verwandt sind und zu einer Genfamilie im *S. solfataricus* Genom gehören, die aus 7 Mitgliedern besteht. Sie codieren N-terminale coiled-coil Domänen und konservierte C-Termini, die Ähnlichkeiten mit RecB-ähnlichen Endonukleasen haben. Homologe dieser Gene findet man in Crenarchaea und Cyanobakterien, entferntere Verwandte ohne coiled-coil Domänen auch in vielen anderen Vertretern der Archaea. RecB-Proteine sind an der homologen Rekombination und Reparatur von DNA beteiligt. Es wurde bereits gezeigt, dass Archaea aktive DNA-Reparaturmechanismen besitzen, um die unvermeidlichen Schäden ihres genetischen Materials zu korrigieren (DiRuggiero *et al.*, 1997), und man hat erste Hinweise darauf, dass diese durch Hitzeschock induzierbar sind (Shockley *et al.*, 2003). Es ist noch nicht bekannt, ob *Sulfolobus* adaptive DNA-Reparatursysteme, ähnlich der *SOS response* von *E. coli*, besitzt. Die Identifizierung der RecB-Endonukleasen-verwandten Genfamilie muss in *Sulfolobus* auf eine noch unbekannte Weise bei Hitzeschock relevant sein, da die drei ORFs unabhängig voneinander und sogar wiederholt (SSO1752) nach Hitzeschock identifiziert wurden. Als Schlussfolgerung drängt sich die Vermutung auf, dass hier eventuell eine neue Genfamilie identifiziert wurde, die DNA-Reparatur und Rekombinationen unter Hitzeschock durchführen könnte.

Ein weiteres Hitzeschockgen mit hypothetischer Funktion in Archaea war SSO0110, für das bereits nach 5 Minuten Hitzeschock deutlich erhöhte mRNA-Mengen ermittelt wurden. Die abgeleitete Proteinsequenz enthält eine konservierte DUF Domäne mit unbekannter Funktion, die zusammen mit zwei CBS Domänen vorkommt. CBS Domänen werden mit verschiedenen Proteindomänen assoziiert gefunden und besitzen möglicherweise eine regulatorische Rolle. Sie können zu Paaren dimerisieren

und stabile, globuläre Einheiten bilden. Die DUF Domäne ist entfernt mit der HrcA Domäne des bakteriellen Repressors verwandt. Das HrcA/CIRCE System ist der am weitesten verbreitete, negative Kontrollmechanismus bei Bakterien und reguliert u.a. auch die Transkription des Hsp60-Homologs GroEL (s.a. Einleitung). Homologe Sequenzen von SSO0110 wurden sowohl in Crenarchaeota als auch in Euryarchaeota gefunden. Möglicherweise könnte dieses Gen für einen neuen Regulator der Archaea codieren, der die Transkription von Hitzeschockgenen reguliert.

6.6. Identifizierung von Hitzeschock-Promotoren

Um einen Einblick in die Regulation von Hitzeschockgenen in *Sulfolobus* zu erhalten, wurden mittels *primer extension* die Transkriptionsstartstellen der alpha und beta Untereinheit des Thermosoms sowie von fünf neu identifizierten Hitzeschockgenen bestimmt. Dazu gehörte ein Vertreter der coiled-coil Familie (SSO1469), der HrcA-verwandte ORF SSO0110, die putative Transposase SSO1474 und die beiden ORFs SSO1119 und SSO1586 mit hypothetischen Funktionen, die nur in *S. solfataricus* und *S. tokodaii* vorkommen. Mit Ausnahme von SSO1474 hatten alle Transkripte nicht-translatierte Leitsequenzen unterschiedlicher Längen. In einer Entfernung von 23 bis 26 Nukleotide stromauf des Transkriptionsstarts wurden jeweils eine TATA-Box und ein BRE-Element identifiziert, die dem von Bell *et al.* (1999) für Archaea vorgeschlagenen Konsensus folgten. Zur Identifizierung regulatorischer Elemente wurden die Regionen um die Promotoren herum auf Sequenzübereinstimmungen untersucht. Dabei wurde zwischen den basalen Promotorelementen und dem Transkriptionsstart eine 6 bis 10 Nukleotide lange, invertierte und AT-reiche Sequenzwiederholung identifiziert. Die Nukleotidabfolge war zwar nicht sehr stark konserviert, jedoch war die Position vor dem Transkriptionsstart der Gene als auch die Invertierung der Sequenz ähnlich. Vor dem *tf55alpha*-Gen war diese Struktur nicht zu finden, statt dessen war an dieser Position nur eine kurze AT-Abfolge vorhanden. Eine zweite, ebenfalls AT-reiche Struktur, lag direkt stromab oder teilweise innerhalb der TATA-Box. Hier konnte der Konsensus TAAAC abgeleitet werden. Diese beiden Elemente könnten potentielle, *cis*-regulatorische Elemente der

Hitzeschockgene darstellen. Da das *tf55alpha*-Gen keine invertierte Sequenzwiederholung stromab vom Promotor besitzt, könnte man hier eine andere Regulation vermuten. Die ermittelten Induktionen von *tf55alpha* waren mindestens doppelt so hoch im Vergleich mit den anderen Hitzeschockgenen, was diese Vermutung bestätigt.

Stromauf der Promotorelemente wurden nur schwache Sequenzübereinstimmungen gefunden. Auch die Untersuchung dieser Regionen nach palindromischen Sequenzen hat wenig gemeinsame Eigenschaften ergeben.

Die Bedeutung der in dieser Arbeit dargestellten Sequenzen ist unklar und muss daher durch weitere Analysen in einem *in vivo*- oder *in vitro*-System untersucht werden.

6.7. Hypothese zur Regulation von Hitzeschockgenen in *Sulfolobus*

Aus Mutationsstudien der Promotorregion des Chaperonins von *Haloferax volcanii* ist bekannt, dass für Hitzeinduktion die TATA-Box unmittelbar flankierende Sequenzen wichtig sind (Thompson & Daniels, 1998). Ein Vergleich der DNA-Bindestellen bisher bekannter archaealer Regulatoren hat ergeben, dass Repressoren entweder den Promotor überlappend oder die Transkriptionsinitiationsstelle umgebend binden und dadurch mit der basalen Transkriptionsmaschinerie in Konkurrenz treten können (Reeve, 2003). Diese Untersuchungen stimmen mit den Positionen der in dieser Arbeit identifizierten, potentiellen *cis*-regulatorischen Strukturen überein. Ausserdem wurde in Archaea mit mehreren TFB-homologen Genen beobachtet, dass ein TFB-Transkript speziell unter Hitzeschock induziert wird (Thompson *et al.*, 1999; Shockley *et al.*, 2003). Dies konnte in dieser Studie auch für TFB-1 von *Sulfolobus* gezeigt werden.

Mit SSO0110 wurde ein potentieller Regulator identifiziert, der strukturelle Ähnlichkeiten mit dem Repressor HrcA von Hitzeschockgenen aus Bakterien besitzt. HrcA reprimiert unter normalen Bedingungen die Synthese von Hitzeschockproteinen und die eigene, indem es an eine invertierte Sequenzwiederholung aus neun Nukleotiden (CIRCE) bindet, die sich zwischen Promotor und Translationsstart

befindet. Bei Hitzeschock wird der Repressor inaktiv und dissoziiert von der DNA-Bindestelle weg, so dass die Transkription der Hitzeschockgene stattfinden kann. Das CIRCE-Element wurde in mehr als 70 Operons von über 40 bakteriellen Spezies identifiziert (Gram-positive Bakterien, Proteobakterien, Cyanobakterien).

In dieser Studie wurden sowohl kurze Sequenzwiederholungen vor den untersuchten *Sulfolobus* Hitzeschockgenen gefunden und es wurde mit SSO0110 ein potentieller Regulator identifiziert. An dieser Stelle drängt sich die Hypothese auf, für SSO0110 eine HrcA-ähnliche Funktion zu postulieren. Das Genprodukt könnte seine eigene und die Transkription von Hitzeschockgenen, die zwischen Promotor und Transkriptionsstart über die in dieser Arbeit identifizierte AT-reiche Sequenzwiederholung verfügen, negativ regulieren. Bei Hitzeschock würde nach Inaktivierung des potentiellen Repressors die Transkription induziert werden können, woran letztlich das hitzeinduzierbare TFB-1 beteiligt sein könnte. Das *tf55alpha*-Gen wird vermutlich auf eine noch unbekannte Weise anders reguliert, da zum einen die invertierte Sequenzwiederholung nicht erkennbar war und zum anderen eine wesentlich stärkere Induktion nach Hitzeschock bestimmt wurde.

6.8. Modell der Hitzeschockreaktion in *Sulfolobus*

Anhand der in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse, lässt sich ein partielles Modell der Hitzeschockreaktion in *Sulfolobus* erstellen (Abb. 17): Nach Hitzeschock könnte der potentielle Repressor von dem putativen regulatorischen Element stromauf des Transkriptionsstarts der Hitzeschockgene abdissoziieren, wodurch diese induziert werden könnten. Der basale Transkriptionsfaktor TFB-1 könnte dabei einen positiven, regulatorischen Effekt auf die Transkription dieser Gene ausüben. Schäden der DNA, die durch Hitzeschock entstünden, würden durch die mit RecB-Endonukleasen verwandte Genfamilie repariert werden, die selbst unter der negativen Kontrolle des Repressors stehen und nach Hitzeschock ebenfalls induziert werden würden.

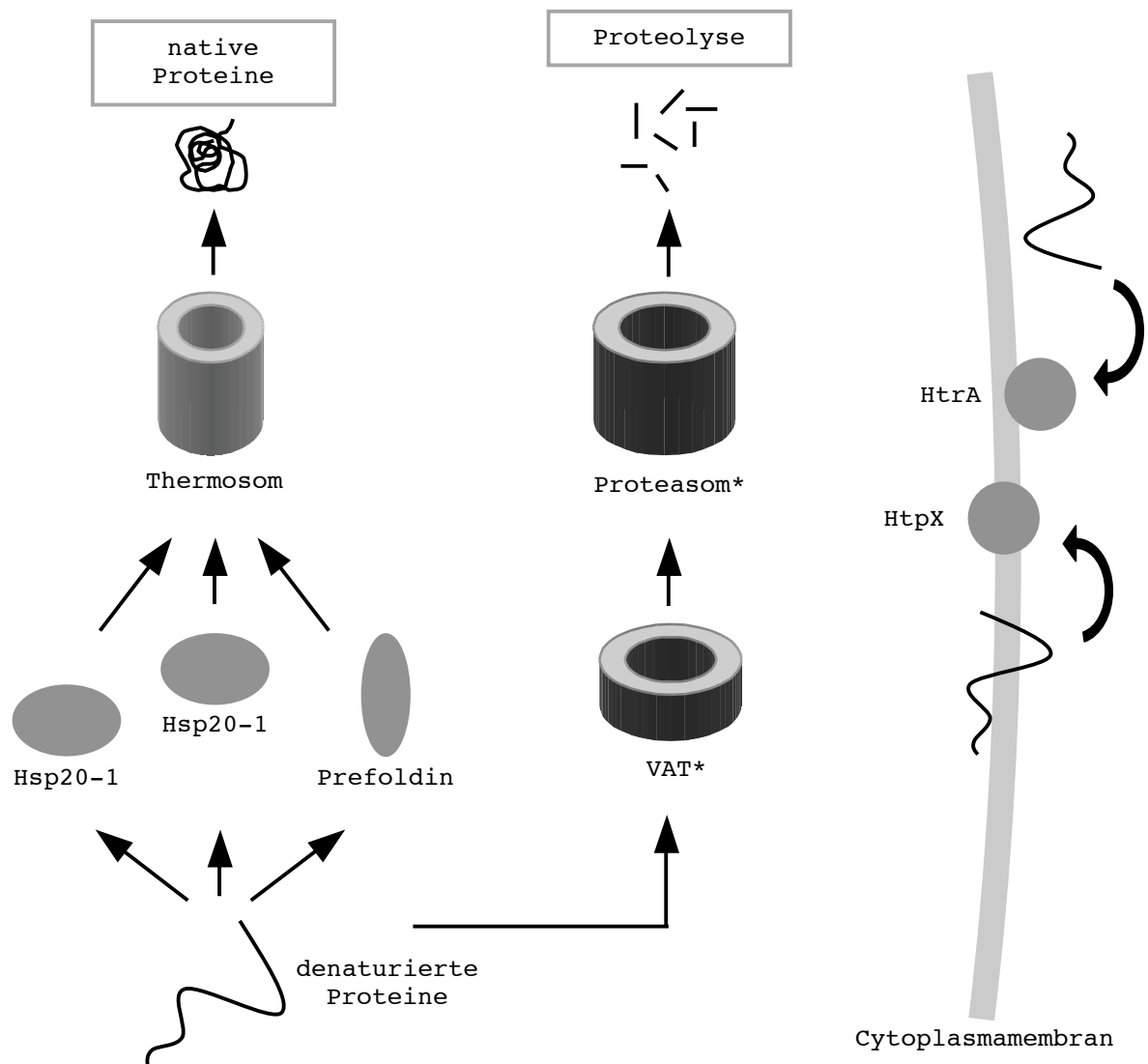


Abbildung 17: Schematische Darstellung der putativen Hitzeschockreaktion in *S. solfataricus* (oberer Teil modifiziert nach Ruepp *et al.*, 2001; Shockley *et al.*, 2003). Mit einem Fragezeichen sind solche Hitzeschockproteine versehen, deren Funktion an der Hitzeschockreaktion unbekannt ist und über die nur spekuliert werden kann. Die mit einem Stern gekennzeichneten Proteine wurden in dieser Studie nicht untersucht.

Die aufgrund des Hitzeschocks entfalteten Proteine können zwei Wege beschreiten, wobei das Thermosom und die Protease VAT eine Qualitätskontrolle für die Proteine in der Zelle bilden. Sie können entweder direkt proteolytisch abgebaut werden, indem sie an das Proteasom weitergereicht werden, oder sie werden von den Chaperonen Hsp20 und Prefoldin gebunden und bis zur Rückfaltung durch das Thermosom stabilisiert. Die Genprodukte der beiden Homologen der Proteasen HtpX und HtrA könnten für die Proteolyse denaturierter Proteine in bzw. ausserhalb der Cytoplasmamembran zuständig sein (Modell in Anlehnung an Ruepp *et al.*, 2001; Shockley *et al.*, 2003).

7. Literaturverzeichnis

- Aravind, L., Koonin, E.V. (1999). DNA-binding proteins and evolution of transcription regulation in the archaea. *Nucleic Acids Res.* 27: 4658-4670.
- Aravind, L., Makarova, K.S., Koonin, E.V. (2000). SURVEY AND SUMMARY: holliday junction resolvases and related nucleases: identification of new families, phyletic distribution and evolutionary trajectories. *Nucleic Acids Res.* 28: 3417-3432.
- Archibald, J.M., Logsdon, J.M., Doolittle, W.F. (1999). Recurrent paralogy in the evolution of archaeal chaperonins. *Curr. Biol.* 9: 1053-1056.
- Archibald, J.M., Blouin, C., Doolittle, W.F. (2001). Gene duplication and the evolution of group II chaperonins: implications for structure and function. *J. Struct. Biol.* 135: 157-169.
- Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. (1998). *Current protocols in molecular biology*. Green Publishing Associates and Wiley-Interscience, New York.
- Baliga, N.S., Goo, Y.A., Ng, W.V., Hood, L., Daniels, C.J., DasSarma, S. (2000). Is gene expression in *Halobacterium* NRC-1 regulated by multiple TBP and TFB transcription factors? *Mol. Microbiol.* 36: 1184-1185.
- Bateman, A. (1997). The structure of a domain common to archaeobacteria and the homocystinuria disease protein. *Trends Biochem. Sci.* 22: 12-13.
- Bell, S.D., Jaxel, C., Nadal, M., Kosa, P.F., Jackson, S.P. (1998). Temperature, template topology and factor requirements of archaeal transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 15218-15222.
- Bell, S.D., Cairns, S.S., Robson, R.L., Jackson, S.P. (1999a). Transcriptional regulation of an archaeal operon *in vivo* and *in vitro*. *Mol. Cell* 4: 971-982.
- Bell, S.D., Kosa, P.L., Sigler, P.B., Jackson, S.P. (1999b). Orientation of the transcription preinitiation complex in Archaea. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 13662-13667.
- Bell, S.D., Jackson, S.P. (2000). Mechanism of autoregulation by an archaeal transcriptional repressor. *J. Biol. Chem.* 275: 31624-31629.
- Bell, S.D., Brinkman, A.B., van der Oost, J., Jackson, S.P. (2001). The archaeal TFIIE alpha homologue facilitates transcription initiation by enhancing TATA-box recognition. *EMBO Rep.* 2: 133-138.

- Bell, S.D., Jackson, S.P. (2001). Mechanism and regulation of transcription in archaea. *Curr. Opin. Microbiol.* 4: 208-213.
- Benelli, D., Maone, E., Londei, P. (2003). Two different mechanisms for ribosome/mRNA interaction in archaeal translation initiation. *Mol. Microbiol.* 50: 635-643.
- Bidle, K.A. (2003). Differential expression of genes influenced by changing salinity using RNA arbitrarily primed PCR in the archaeal halophile *Haloferax volcanii*. *Extremophiles* 7: 1-7.
- Bloch, E., Rachel, R., Burggraf, S., Hafenbradl, D., Jannasch, H.W., Stetter, K.O. (1997). *Pyrolobus fumarii*, gen. and sp. nov., represents a novel group of archaea, extending the upper temperature limit for life to 113°C. *Extremophiles* 1: 14-21.
- Bouthier de la Tour, C., Portemer, C., Nadal, M., Stetter, K.O., Forterre, P., Duguet, M. (1990). Reverse gyrase, a hallmark of the hyperthermophilic archaeobacteria. *J. Bacteriol.* 172: 6803-6808.
- Bouthier de la Tour, C., Portemer, C., Huber, R., Forterre, P., Duguet, M. (1991). Reverse gyrase in thermophilic eubacteria. *J. Bacteriol.* 173: 3921-3923.
- Braig, K., Otwinowski, Z., Hegde, R., Boisvert, D.C., Joachimiak, A., Horwich, A.L., Sigler, P.B. (1994). The crystal structure of the bacterial chaperonin GroEL at 2.8 Å. *Nature* 371: 578-586.
- Brinkman, A.B., Dahlke, I., Tuininga, J.E., Lammers, T., Dumay, V., de Heus, E., Lebbink, J.H.G., Thomm, M., de Vos, W.M., van der Oost, J. (2000). An Lrp-like transcriptional regulator from the archaeon *Pyrococcus furiosus* is negatively autoregulated. *J. Biol. Chem.* 275: 38160-38169.
- Brinkman, A.B., Bell, S.D., Lebbink, R.J., de Vos, W.M., van der Oost, J. (2002). The *Sulfolobus solfataricus* Lrp-like protein LysM regulates lysine biosynthesis in response to lysine availability. *J. Biol. Chem.* 277: 29537-29549.
- Brock, T.D., Brock, K.M., Belly, R.T., Weiss, R.L. (1972). *Sulfolobus*: a new genus of sulfur-oxidizing Bacteria living at low pH and high temperature. *Arch. Microbiol.* 84: 54-68.
- Bukau, B., Horwich, A.L. (1998). The HSP70 and HSP60 chaperone machines. *Cell* 92: 351-366.
- Bullock, W.O., Fernandez, J.M., Cline, S.W., Doolittle, W.F. (1987). XL-1 Blue: a high efficiency plasmid transforming *recA* *Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *Biotechniques* 5: 376-379.

- Chomczynski, P., Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162: 156-159.
- Colonna-Romano, S., Leone, A., Maresca, B. (1998). Differential-Display Reverse Transcription-PCR (DDRT-PCR). *Springer Lab Manual*, Springer-Verlag Heidelberg.
- Condo, I., Ciammaruconi, A., Benelli, D., Ruggero, D., Londei, P. (1999). Cis-acting signals controlling translational initiation in the thermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Mol. Microbiol.* 34: 377-384.
- Dahlke, I., Thomm, M. (2002). A *Pyrococcus* homolog of the leucine-responsive regulatory protein, LrpA, inhibits transcription by abrogating RNA polymerase recruitment. *Nucleic Acids Res.* 30: 701-710.
- De Biase, A., Macario, A.J.L., Conway de Macario, E. (2002). Effect of heat stress on promoter binding by transcription factors in the cytosol of the archaeon *Metanosarcina mazei*. *Gene* 282: 189-197.
- DeLong, E.F., Wu, K.Y., Prezelin, B.B., Jovine, R.V. (1994). High abundance of archaea in antarctic marine picoplankton. *Nature* 371: 695-697.
- Deppenmeier, U., Johann, A., Hartsch, T., Merkl, R., Schmitz, R.A., Martinez-Arias, R. et al. (2002). The genome of *Methanosarcina mazei*: evidence for lateral gene transfer between bacteria and archaea. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 4: 453-461.
- De Rosa, M., Gambacorta, A., Nicolaus, B., Giardina, P., Poerio, E., Buonocore, V. (1984). Glucose metabolism in the extreme thermoacidophilic archaeobacterium *Sulfolobus solfataricus*. *Biochem. J.* 224: 407-414.
- De Rosa, M., Gambacorta, A., Huber, R., Lanzotti, V., Nicolaus, B., Stetter, K.O., Trincone, A. (1989) in: *Microbiology of extreme environments and its potential for biotechnology* (da Costa, M.S., Duarte, J.C., Williams, R.A.D., Eds.), pp. 167-173, Elsevier Applied Science, London and New York.
- DiRuggiero, J., Santangelo, N., Nackerdien, Z., Ravel, J., Robb, F.T. (1997). Repair of extensive ionizing-radiation DNA damage at 95°C in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *J. Bacteriol.* 179: 4643-4645.
- Dower, W.J., Miller, J.F., Ragsdale, C.W. (1988). High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* 16: 6127-6145.
- Ellis, M.J., Knapp, S., Koeck, P.J., Fakoor-Biniyaz, Z., Ladenstein, R., Hebert, H. (1998). Two-dimensional crystallization of the chaperonin TF55 from the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *J. Struct. Biol.* 123: 30-36.

- Fayet, O., Ziegelhoffer, T., Georgopoulos, C. (1989). The *groES* and *groEL* heat shock gene products of *Escherichia coli* are essential for bacterial growth at all temperatures. J. Bacteriol. 171: 1379-1385.
- Ferrandez, A., Minambres, B., Garcia, B., Olivera, E.R., Luengo, J.M., Garcia, J.L., Diaz, E. (1998). Catabolism of phenylacetic acid in *Escherichia coli*. Characterization of a new aerobic hybrid pathway. J. Biol. Chem. 273: 25974-25986.
- Fislag, R., Berceanu, M., Humboldt, Y., Wendt, M., Oberender, H. (1997). Primer design for a prokaryotic differential display RT-PCR. Nucleic Acids Res. 25: 1830-1835.
- Fleming, J.T., Yao, W.H., Sayler, G.S. (1998). Optimization of differential display of prokaryotic mRNA: application to pure culture and soil microcosms. Appl. Environ. Microbiol. 64: 3698-3706.
- Frydman, J., Nimmesgern, E., Erdjument-Bromage, H., Wall, J.S., Tempst, P., Hartl, F.U. (1992). Function in protein folding of TRiC, a cytosolic ring complex containing TCP-1 and structurally related subunits. EMBO J. 11: 4767-4778.
- Fuchs, T., Huber, H., Burggraf, S., Stetter, K.O. (1996). 16S rDNA-based phylogeny of the archaeal order *Sulfolobales* and reclassification of *Desulfurolobus ambivalens* as *Acidianus ambivalens* comb. nov.. Sytem. Appl. Microbiol. 19: 56-60.
- Furutani, M., Iida, T., Yoshida, T., Maruyama, T. (1998). Group II chaperonin in a thermophilic methanogen, *Methanococcus thermolithotrophicus*. Chaperone activity and filament-forming ability. J. Biol. Chem. 273: 28399-28407.
- Geissler, S., Siegers, K., Schiebel, E. (1998). A novel protein complex promoting formation of functional α - and β -tubulin. EMBO J. 17: 952-966.
- Gelfand, M.S., Koonin, E.V., Mironov, A.A. (2000). Prediction of transcription regulatory sites in Archaea by a comparative genomic approach. Nucleic Acids Res. 28: 695-705.
- Gill, R.T., Valdes, J.J., Bentley, W.E. (1999). Reverse transcription-PCR differential display analysis of *Escherichia coli* global gene regulation in response to heat shock. Appl. Environ. Microbiol. 65: 5386-5393.
- Glass, J.I., Lefkowitz, E.J., Glass, J.S., Heiner, C.R., Chen, E.Y., Cassell, G.H. (2000). The complete sequence of the mucosal pathogen *Ureaplasma urealyticum*. Nature 407: 757-762.
- Golbik, R., Lupas, A.N., Koretke, K.K., Baumeister, W., Peters, J. (1999). The Janus face of the archaeal Cdc48/p97 homologue VAT: protein folding versus unfolding. Biol. Chem. 380: 1049-1062.

- Grogan, D.W. (1989). Phenotypic characterization of the archaeobacterial genus *Sulfolobus*: comparison of five wild-type strains. *J. Bacteriol.* 171: 6710-6719.
- Grogan, D.W., Palm, P., Zillig, W. (1990). Isolate B12, which harbours a virus-like element, represents a new species of the archaeobacterial genus *Sulfolobus*, *Sulfolobus shibatae*, sp. nov.. *Arch. Microbiol.* 154: 594-599.
- Gross, C.A. (1996) Function and regulation of heat shock proteins. In Neidhardt, F.C., (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella*. Cellular and Molecular Biology. ASM Press, Washington D.C., pp. 1382-1399.
- Hain, J., Reiter, W.D., Hüdepohl, U., Zillig, W. (1992). Elements of an archaeal promoter defined by mutational analysis. *Nucleic Acids Res.* 20: 5423-5428.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166: 557-580.
- Hanzelka, B.L., Darcy, T.J., Reeve, J.N. (2001). TFE, an archaeal transcription factor in *Methanobacterium thermoautotrophicum* related to eucaryal transcription factor TFIIE alpha. *J. Bacteriol.* 183: 1813-1818.
- Hausner, W., Wettach, J., Hethke, C., Thomm, M. (1996). Two transcription factors related with the eucaryal transcription factors TATA-binding protein and transcription factor IIB direct promoter recognition by an archaeal RNA polymerase. *J. Biol. Chem.* 271: 30144-30148.
- Hecker, M., Schumann, W., Völker, U. (1996). Heat-shock and general stress response in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 19: 417-428.
- Hedderich, R., Klimmek, O., Kröger, A., Dirmeier, R., Keller, M., Stetter, K.O. (1998). Anaerobic respiration with elemental sulfur and with disulfides. *FEMS Microbiol. Rev.* 22: 353-381.
- Helmann, J.D., Wu, M.F.W., Kobel, P.A., Gamo, F.-J., Wilson, M., Morshedi, M.M., Paddon, C. (2001). Global transcriptional response of *Bacillus subtilis* to heat shock. *J. Bacteriol.* 183: 7318-7328.
- Hemmingsen, S.M., Woolford, C., van der Vies, S.M., Tilly, K., Dennis, D.T., Georgopoulos, C.P., Hendrix, R.W., Ellis, R.J. (1988) Homologous plant and bacterial proteins chaperone oligomeric protein assembly. *Nature* 333: 330-334.
- Hethke, C., Geerling, A.C.M., Hausner, W., de Vos, W.M., Thomm, M. (1996). A cell-free transcription system for the hyperthermophilic Archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Nucleic Acids Res.* 24: 2369-2376.

- Hethke, C. Bergerat, A., Hausner, W., Forterre, P., Thomm, M. (1999). Cell-free transcription at 95°C: thermostability of transcriptional components and DNA topology requirements of *Pyrococcus* transcription. *Genetics* 152: 1325-1333.
- Hochheimer, A., Hedderich, R., Thauer, R.K. (1999). The DNA binding protein Tfx from *Methanobacterium thermoautotrophicum*: structure, DNA binding properties and transcriptional regulation. *Mol. Microbiol.* 31: 641-650.
- Hofacker, A., Schmitz, K.M., Cichonczyk, A., Sartorius-Neef, S., Pfeifer, F. (2004). GvpE- and GvpD-mediated transcription regulation of the p-gvp genes encoding gas vesicles in *Halobacterium salinarum*. *Microbiology* 150: 1829-1838.
- Homuth, G., Mogk, A., Schumann, W. (1999). Post-transcriptional regulation of the *Bacillus subtilis* *dnaK* operon. *Mol. Microbiol.* 32: 1183-1197.
- Huber, R., Huber, H., Stetter, K.O. (2000). Towards the ecology of hyperthermophiles: biotops, new isolation strategies and novel metabolic properties. *FEMS Microbiol. Rev.* 24: 615-623.
- Huber, H., Hohn, M.J., Rachel, R., Fuchs, T., Wimmer, V.C., Stetter, K.O. (2002). A new phylum of Archaea represented by a nanosized hyperthermophilic symbiont. *Nature* 417: 63-67.
- Jones, B.E., Grant, W.D., Duckworth, A.W., Owenson, G.G. (1998). Microbial diversity of soda lakes. *Extremophiles* 2: 191-200.
- Jonuscheit, M., Martusewitsch, E., Stedman, K.M., Schleper, C. (2003). A reporter gene system for the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* based on a selectable and integrative shuttle-vector. *Mol. Microbiol.* 48: 1241-1252.
- Kagawa, H.K., Osipiuk, J., Maltsev, N., Overbeek, R., Quate-Randall, E., Joachimiak, A., Trent, J.D. (1995). The 60 kDa heat shock proteins in the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus shibatae*. *J. Mol. Biol.* 253: 712-725.
- Kagawa, H.K., Yaoi, T., Brocchieri, L., McMillan, R.A., Alton, T., Trent, J.D. (2003). The composition, structure and stability of a group II chaperonin are temperature regulated in a hyperthermophilic archaeon. *Mol. Microbiol.* 48: 143-156.
- Kashefi, K., Lovley, D.R. (2003). Extending the upper temperature limit for life. *Science* 301: 934.
- Kawarabayasi, Y., Hino, Y., Horikawa, H., Jin-no, K., Takahashi, M., Sekine, M., Baba, S., et al. (2001). Complete genome sequence of an aerobic thermoacidophilic crenarchaeon, *Sulfolobus tokodaii* strain 7. *DNA Res.* 8: 123-140.

- Ken, R., Hackett, N.R. (1991). *Halobacterium halobium* strains lysogenic for phage phi H contain a protein resembling coliphage repressors. J. Bacteriol. 173: 955-960.
- Knapp, S., Schmidt-Krey, I., Hebert, H., Bergmann, T., Jörnvall, H., Ladenstein, R. (1994). The molecular chaperonin TF55 from the thermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. J. Mol. Biol. 242: 397-407.
- Koch, R., Zabowski, P., Spreinat, A., Antranikian, G. (1990). Extremely thermostable amylolytic enzyme from the archaebacterium *Pyrococcus furiosus*. FEMS Microbiol. Lett. 71: 21-26.
- Komori, K., Miyata, T., DiRuggiero, J., Holley-Shanks, R., Hayashi, I., Cann, I.K., Mayanagi, K., Shinagawa, H., Ishino, Y. (2000). Both RadA and RadB are involved in homologous recombination in *Pyrococcus furiosus*. J. Biol. Chem. 275: 33782-33790.
- Kornitzer, D., Teff, D., Altuvia, S., Oppenheim, A.B. (1991). Isolation, characterization, and sequence of an *Escherichia coli* heat shock gene, *htpX*. J. Bacteriol. 173: 2944-2953.
- Kowalak, J., Dalluge, J., McCloskey, J., Stetter, K. (1994). The role of posttranscriptional modification in stabilization of transfer RNA from hyperthermophiles. Biochemistry 33: 7869-7876.
- Krüger, K., Hermann, T., Armbruster, V., Pfeifer, F. (1998). The transcriptional activator GvpE for the halobacterial gas vesicle genes resembles a basic region leucine-zipper regulatory protein. J. Mol. Biol. 279: 761-771.
- Kumar, S., Nussinov, R. (2001). How do thermophilic proteins deal with heat? Cell. Mol. Life Sci. 58: 1216-1233.
- Kwaik, Y.A., Pederson, L.L. (1996). The use of differential display-PCR to isolate and characterize a *Legionella pneumophila* locus induced during the intracellular infection of macrophages. Mol. Microbiol. 21: 543-556.
- Kyrpides, N.C., Ouzounis, C.A. (1999). Transcription in Archaea. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 8545-8550.
- Laksanalamai, P., Maeder, D.L., Robb, F.T. (2001). Regulation and mechanism of action of the small heat shock protein from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. J. Bacteriol. 183: 5198-5202.
- Laksanalamai, P., Robb, F.T. (2003). Small heat shock proteins from extremophiles: a review. Extremophiles published online: 19 November 2003.

- Lee, S.-J., Engelmann, A., Horlacher, R., Qu, Q., Vierke, G., Hebbeln, C., Thomm, M., Boos, W. (2003). TrmB, a sugar-specific transcriptional regulator of the trehalose/maltose ABC transporter from the hyperthermophile archaeon *Thermococcus litoralis*. J. Biol. Chem. 278: 983-990.
- Leigh, J.A. (1999). Transcriptional regulation in Archaea. Curr. Opin. Microbiol. 2: 131-134.
- Leroux, M.R., Fändrich, M., Klunker, D., Siegers, K., Lupas, A.N., Brown, J.R., Schiebel, E., Dobson, C.M., Hartl, F.U. (1999). MtGimC, a novel archaeal chaperone related to the eukaryotic chaperonin cofactor GimC/prefoldin. EMBO J. 18: 6730-6743.
- Liang, P., Pardee, A.B. (1992). Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. Science 257: 967-971.
- Lottspeich, F., Zorbas, H. (Hrsg.) Bioanalytik. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 1998.
- Lund, P.A., Large, A.T., Kapatai, G. (2003). The chaperonins: perspectives from the Archaea. Biochem. Soc. Trans. 31: 681-685.
- Lupas, A.N., Flanagan, J.M., Tamura, T., Baumeister, W. (1997). Self-compartmentalizing proteases. Trend Biochem. Sci. 22: 399-404.
- Macario, A.J.L., Lange, M., Ahring, B.K., Conway de Macario, E. (1999). Stress genes and proteins in the Archaea. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 63: 923-967.
- Mander, G.J., Duin, E.C., Linder, D., Stetter, K.O., Hedderich, R. (2002). Purification and characterization of a membrane-bound enzyme complex from the sulfate-reducing archaeon *Archaeoglobus fulgidus* related to heterodisulfide reductase from methanogenic archaea. Eur. J. Biochem. 269: 1895-1904.
- Martin, J., Hartl, F.U. (1997). Chaperone-assisted protein folding. Curr. Opin. Struct. Biol. 7: 41-52.
- Martusewitsch, E. (1998). Isolierung Uracil-auxotropher Mutanten eines hyperthermophilen Archaeons: Insertionselemente erzeugen erhöhte Mutationsraten in *Sulfolobus solfataricus* P1. Diplomarbeit, TU Darmstadt.
- Martusewitsch, E., Sensen, C.W., Schleper, C. (2000). High spontaneous mutation rate in the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* is mediated by transposable elements. J. Bacteriol. 182: 2574-2581.
- McKenzie, S.L., Henikoff, S., Meselson, M. (1975). Localization of RNA from heat-induced polysomes at puff sites in *Drosophila melanogaster*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72: 1117-1121.

- Minder, A.C., Fischer, H.M., Hennecke, H., Narberhaus, F. (2000). Role of HrcA and CIRCE in the heat shock regulatory network of *Bradyrhizobium japonicum*. J. Bacteriol. 182: 14-22.
- Missiakas, D., Raina, S. (1998). The extracytoplasmic function sigma factors: role and regulation. Mol. Microbiol. 28: 1059-1066.
- Mogk, A., Homuth, G., Scholz, C., Kim, L., Schmidt, F.X., Schumann, W. (1997). The GroE chaperonin machine is a modulator of the CIRCE heat shock regulon of *Bacillus subtilis*. EMBO J. 16: 4579-4590.
- Morimoto, R.I. (1998). Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. Genes Dev. 12: 3788-3796.
- Napoli, A., van der Oost, J., Sensen, C.W., Charlebois, R.L., Rossi, M., Ciaramella, M. (1999). An Lrp-like protein of the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* which binds to its own promoter. J. Bacteriol. 181: 1474-1480.
- Narberhaus, F., Krummenacher, P., Fischer, H.M., Hennecke, H. (1997). Three disparately regulated genes for σ^{32} -like transcription factors in *Bradyrhizobium japonicum*. Mol. Microbiol. 24: 93-104.
- Narberhaus, F., Käser, R., Nocker, A., Hennecke, H. (1998). A novel DNA element that controls bacterial heat shock gene expression. Mol. Microbiol. 28: 315-323.
- Narberhaus, F. (1999). Negative regulation of bacterial heat shock genes. Mol. Microbiol. 31: 1-8.
- Narberhaus, F. (2002). Alpha-crystallin-type heat shock proteins: socializing minichaperones in the context of a multichaperone network. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 66: 64-93.
- Neuwald, A.F., Aravind, L., Spouge, J.L., Koonin, E.V. (1999). AAA+: a class of chaperone-like ATPases associated with assembly, operating and disassembly of protein complexes. Genome Res. 9: 27-43.
- Nickells, R.W., Browder, L.W. (1988). A role for glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in the development of thermotolerance in *Xenopus laevis* embryos. J. Cell Biol. 107: 1901-1909.
- Nocker, A., Hausherr, T., Balsiger, S., Krustulovic, N.-P., Hennecke, H., Narberhaus, F. (2001). A mRNA-based thermosensor controls expression of rhizobial heat shock genes. Nucleic Acids Res. 29: 4800-4807.

- Okochi, M., Yoshida, T., Maruyama, T., Kawarabayasi, Y., Kikuchi, H., Yohda, M. (2002). *Pyrococcus* prefoldin stabilizes protein-folding intermediates and transfers them to chaperonins for correct folding. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 291: 769-74.
- Olivera, E.R., Minambres, B., Garcia, B., Muniz, C., Moreno, M.A., Ferrandez, A. *et al.* (1998). Molecular characterization of the phenylacetic acid catabolic pathway in *Pseudomonas putida* U: the phenylacetyl-CoA catabolon. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 6419-6424.
- Oren, A. (1994). The ecology of the extremly halophilic archaea. *Microbiol. Rev.* 13: 415-440.
- Pallen, M.J., Wren, B.W. (1997). The HtrA family of serine proteases. *Mol. Microbiol.* 26: 209-221.
- Palmer, J.R., Daniels, C.J. (1995). In vivo definition of an archaeal promoter. *J. Bacteriol.* 177: 1844-1849.
- Parsell, D.A., Sauer, R.T. (1989). Induction of a heat shock-like response by unfolded protein in *Escherichia coli*: dependence on protein level not protein degradation. *Genes Dev.* 3: 1226-1232.
- Patel, S., Latterich, M. (1998). The AAA team: related ATPases with diverse functions. *Trends Cell Biol.* 8: 65-71.
- Pfeifer, F., Blaseio, U. (1990). Transposition burst of the ISH 27 insertion element family in *Halobacterium halobium*. *Nucleic Acids Res.* 18: 6921-6925.
- Plösser, P., Pfeifer, F. (2002). A bZIP protein from halophilic archaea: structural features and dimer formation of cGvpE from *Halobacterium salinarum*. *Mol. Microbiol.* 45: 511-520.
- Qureshi, S.A., Bell, S.D., Jackson, S.P. (1997). Factor requirements for transcription in the archaeon *Sulfolobus shibatae*. *EMBO J.* 16: 2927-2936.
- Qureshi, S.A., Jackson, S.P. (1998). Sequence-specific DNA binding by the *S. shibatae* TFIIB homolog, TFB and its effect on promoter strength. *Mol. Cell* 1: 389-400.
- Reddy, T.R., Suryanarayana, T. (1989). Archaeobacterial histone-like proteins. Purification and characterization of helix stabilizing DNA binding proteins from the acidothermophile *Sulfolobus acidocaldarius*. *J. Biol. Chem.* 264: 17298-17308.
- Reeve, J.N. (2003). Archaeal chromatin and transcription. *Mol. Microbiol.* 48: 587-598.

- Reiter, W.D., Hüdepohl, U., Zillig, W. (1990). Mutational analysis of an archaeobacterial promoter: essential role of TATA box for transcription efficiency and start-site selection *in vitro*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 9509-9513.
- Richmond, C.S., Glasner, J.D., Mau, R., Jin, H., Blattner, F.R. (1999). Genome-wide expression profiling in *Escherichia coli* K-12. Nucleic Acids Res. 27: 3821-3835.
- Roberts, R.C., Tootchinda, C., Avedissian, M., Baldini, R.L., Gomes, S.L., Shapiro, L. (1996). Identification of a *Caulobacter crescentus* operon encoding *hrcA*, involved in negatively regulating heat-inducible transcription, and the chaperone gene *grpE*. J. Bacteriol. 178: 1829-1841.
- Ruepp, A., Rockel, B., Gutsche, I., Baumeister, W., Lupas, A.N. (2001). The chaperones of the archaeon *Thermoplasma acidophilum*. J. Struct. Biol. 135: 126-138.
- Ruggero, D., Ciammaruconi, A., Londei, P. (1998). The chaperonin of the archaeon *Sulfolobus solfataricus* is an RNA-binding protein that participates in ribosomal RNA processing. EMBO J. 17: 3471-3477.
- Sambrook & Russel (2001). Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Third Edition, Cold Spring Harbor, New York.
- Sandman, K., Krzycki, J., Dobrinski, B., Lurz, R., Reeve, J. (1990). Hmf, a protein isolated from the hyperthermophilic archaeon *Methanothermus fervidus* is most closely related to histones. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 5788-5791.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463-5467.
- Schleper, C., Röder, R., Singer, T., Zillig, W. (1994). An insertion element of the extremely thermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* transposes into the endogenous beta-galactosidase gene. Mol. Gen. Genet. 243: 91-96.
- Schleper, C., Holz, I., Janekovic, D., Murphy, J., Zillig, W. (1995a). A multicopy plasmid of the extremely thermophilic archaeon *Sulfolobus* effects its transfer to recipients by mating. J. Bacteriol. 177: 4417-4426.
- Schleper, C., Puehler, G., Holz, I., Gambacorta, A., Janekovic, D., Santarius, U., Klenk, H.P., Zillig, W. (1995b). *Picrophilus* gen. nov., fam. nov.: a novel aerobic, heterotrophic, thermoacidophilic genus and family comprising archaea capable of growth around pH 0. J. Bacteriol. 177: 7050-7059.
- Segal, G., Ron, E.Z. (1996). Regulation and organization of the *groE* and *dnaK* operons in Eubacteria. FEMS Microbiol. Lett. 138: 1-10.

- She, Q., Singh, R.K., Confalonieri, F., Zivanovic, Y., Allard, G., Awayez, M.J. et al. (2001). The complete genome of the crenarchaeon *Sulfolobus solfataricus* P2. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 7835-7840.
- Shimohata, N., Chiba, S., Saikawa, N., Ito, K., Akiyama, Y. (2002). The Cpx stress response system of *Escherichia coli* senses plasma membrane proteins and controls HtpX, a membrane protease with cytosolic active site. Genes to Cells 7: 653-662.
- Shockley, K.R., Ward, D.E., Chhabra, S.R., Connors, S.B., Montero, C.I., Kelly, R.M. (2003). Heat shock response in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. Appl. Environ. Microbiol. 69: 2365-2371.
- Soppa, J. (1999). Transcription initiation in Archaea: facts, factors and future aspects. Mol. Microbiol. 31: 1295-1305.
- Soppa, J. (2001). Basal and regulated transcription in archaea. Adv. Appl. Microbiol. 50: 171-217.
- Stedman, K.M., Schleper, C., Rumpf, E., Zillig, W. (1999). Genetic requirements for the function of the archaeal virus SSV1 in *Sulfolobus solfataricus*: construction and testing of viral shuttle vectors. Genetics 152: 1397-1405.
- Stetter, K.O., König, H., Stackebrandt, E. (1983). *Pyrodictium* gen. nov., a new genus of submarine disc-shaped sulphur reducing archaeobacteria growing optimally at 105°C. System. Appl. Microbiol. 4: 535-551.
- Stetter, K.O., Fiala, G., Huber, G., Huber, R., Segerer, A. (1990). Hyperthermophilic microorganisms. FEMS Microbiol. Rev. 75: 117-124.
- Stetter, K.O. (1996). Hyperthermophilic procaryotes. FEMS Microbiol. Rev. 18: 149-158.
- Stetter, K.O. (1999). Extremophiles and their adaptation to hot environments. FEBS Lett. 452: 22-25.
- Stoldt, V., Rademacher, F., Kehren, V., Ernst, J.F., Pearce, D.A., Sherman, F. (1996). Review: the Cct eukaryotic chaperonin subunits of *Saccharomyces cerevisiae* and other yeasts. Yeast. 12: 523-529.
- Stroman, P., Müller, C.C., Sorensen, K.I. (2003). Heat shock treatment increases the frequency of loss of an erythromycin resistance-encoding transposable element from the chromosome of *Lactobacillus crispatus* CHCC3692. Appl. Environ. Microbiol. 69: 7173-7180.
- Thompson, D.K., Daniels, C.J. (1998). Heat shock inducibility of an archaeal TATA-like promoter is controlled by adjacent sequence elements. Mol. Microbiol. 27: 541-551.

- Thompson, D.K., Palmer, J.R., Daniels, C.J. (1999). Expression and heat-responsive regulation of a TFIIB homologue from the archaeon *Haloferax volcanii*. Mol. Microbiol. 33: 1081-1092.
- Trent, J.D., Osipiuk, J., Pinkau, T. (1990). Acquired thermotolerance and heat shock in the extremely thermophilic archaeobacterium *Sulfolobus* sp. strain B12. J. Bacteriol. 172: 1478-1484.
- Trent, J.D., Nimmesgern, E., Wall, J.S., Hartl, F.U., Horwich, A.L. (1991). A molecular chaperone from a thermophilic archaeobacterium is related to the eukaryotic protein t-complex polypeptide-1. Nature 354: 490-493.
- Trent, J.D. (1996) A review of acquired thermotolerance, heat shock proteins, and molecular chaperones in archaea. FEMS Microbiol. Rev. 18: 249-258.
- Trent, J.D., Kagawa, H.K., Yaoi, T., Zaluzec, N.J. (1997). Chaperonin filaments: the archaeal cytoskeleton? Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 5383-5388.
- Trent, J.D., Kagawa, H.K., Paavola, C.D., McMillan, R.A., Howard, J., Jahnke, L., Lavin, C., Embaye, T., Henze, C.E. (2003). Intracellular localization of a group II chaperonin indicates a membrane-related function. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100: 15589-15594.
- Vainberg, I.E., Lewis, S.A., Rommelaere, H., Ampe, C., Vandekerckhove, J., Klein, H.L., Cowan, N.J. (1998). Prefoldin, a chaperone that delivers unfolded proteins to cytosolic chaperonin. Cell 93: 863-873.
- Vale, R.D. (2000). AAA proteins: Lord of the Ring. J. Cell Biol. 150: F13-F19.
- Vierke, G., Engelmann, A., Hebbeln, C., Thomm, M. (2003). A novel archaeal transcriptional regulator of heat shock response. J. Biol. Chem. 278: 18-26.
- Vogelstein, B., Gillespie, D. (1979). Preparative and analytical purification of DNA from agarose. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 615-619.
- Wardleworth, B.N., Russell, R.J., Bell, S.D., Taylor, G.L., White, M.F. (2002). Structure of Alba: an archaeal chromatin protein modulated by acetylation. EMBO J. 21: 4654-4662.
- Woese, C.R., Kandler, O., Wheelis, M.L. (1990). Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria and Eucarya. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 4576-4579.
- Yuk, M.H., Harvill, E.T., Miller, J.F. (1998). The BvgAS virulence control system regulates type III secretion in *Bordetella bronchiseptica*. Mol. Microbiol. 28: 945-959.

- Yura, T., Kanemori, M., Morita, M.T. (2000). The heat shock response: regulation and function. In Storz, G., Hengge-Aronis, R. (eds.), *Bacterial Stress Responses*. ASM Press, Washington, D.C., pp. 3-18.
- Zillig, W., Stetter, K.O., Wunderl, S., Schulz, W., Priess, H., Scholz, I. (1980). The *Sulfolobus*-*Caldariella* group: taxonomy on the basis of the structure of DNA-dependent RNA polymerases. *Arch. Microbiol.* 125: 259-269.
- Zillig, W., Yeats, S., Holz, I., Böck, A., Gropp, F., Rettenberger, M., Lutz, S. (1985). Plasmid-related autotrophy of the novel archaeobacterium *Sulfolobus ambivalens*. *Nature* 313: 787-791.
- Zillig, W., Holz, I., Janekovic, D., Klenk, H.P., Imself, E., Trent, J., Wunderl, S., Forjaz, V.H., Coutinho, R., Ferreira, T. (1990). *Hyperthermus butylicus*, a hyperthermophilic sulfur-reducing archaeobacterium that ferments peptides. *J. Bacteriol.* 172: 3959-3965.
- Zillig, W., Kletzin, A., Schleper, C., Holz, I., Janekovic, D., Hain, J., Lanzendörfer, M., Kristjansson, J.K. (1994). Screening for *Sulfolobales*, their plasmids and their viruses in icelandic solfataras. *System. Appl. Microbiol.* 16: 609-628.
- Zillig, W., Arnold, H.P., Holz, I., Prangishvili, D., Schweier, A., Stedman, K., She, Q., Phan, H., Garrett, R., Kristjansson, J.K. (1998). Genetic elements in the extremely thermophilic archaeon *Sulfolobus*. *Extremophiles* 2: 131-140.
- Zuber, U., Schumann, W. (1994). CIRCE, a novel heat shock element involved in regulation of heat shock operon *dnaK* of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 176: 1359-1363.

Abkürzungen

A	Adenin
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare(e)
C	Cytosin
cfu	Kolonie bildende Einheit
Ci	Curie
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DIG	Digoxygenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxynukleosidtriphosphate
G	Guanin
h	Stunde
hsp	Hitzeschockprotein
IPTG	Isopropylthiogalactosid
kb(p)	Kilobasen(paare)
M	Molar
min	Minuten
nt	Nukleotide
OD	optische Dichte
ORF	offener Leserahmen
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
sec	Sekunden
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSO	offener Leserahmen im <i>S. solfataricus</i> Genom
T	Thymin
Tab.	Tabelle
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	transfer RNA
U	Unit (Einheit der enzymatischen Aktivität)
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indoyl- β -D-galacto-pyranosid

Lebenslauf

Geburtsdatum: 15. Februar 1972
Geburtsort: Kaunas/Litauen

Schul Ausbildung

Erich-Kästner Grundschule Darmstadt 1979-1985
Eleonoren-Gymnasium Darmstadt 1985-1992
Abitur Frühjahr 1992

Akademische Ausbildung

Studium der Biologie an der TU Darmstadt 1992-1998
Diplomprüfung Januar bis Februar 1998
Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe von
Frau Prof. Dr. Felicitas Pfeifer unter der Leitung
von Frau Dr. Christa Schleper am Institut für
Mikrobiologie und Genetik, TU Darmstadt März bis Oktober 1998

Doktorarbeit unter der Anleitung von
Frau PD Dr. Christa Schleper am Institut für
Mikrobiologie und Genetik, TU Darmstadt Januar 1999 bis Juli 2004

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Mikrobiologie und Genetik des Fachbereichs Biologie der Technischen Universität Darmstadt unter Leitung von Frau PD Dr. Christa Schleper angefertigt.

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe und dass ich noch keinen Promotionsversuch unternommen habe.

Darmstadt, Juni 2004

Erika Martusewitsch

Danksagung

Ich danke meiner Doktormama PD Dr. Christa Schleper für das interessante Thema und die wissenschaftliche Freiheit, die sie mir bei der Gestaltung dieser Arbeit gegeben und mich immer darin unterstützt hat. Ausserdem möchte ich ihr dafür danken, dass sie oft die passenden Worte gefunden hat, um mich aus wissenschaftlichen und anderen Krisensituationen herauszuheben.

Frau Prof. Dr. Felicitas Pfeifer möchte ich für ihr stetes Interesse und für neue Denkansätze danken, die mich zuweilen aus wissenschaftlichen Teufelskreisen befreit haben.

Melanie Jonuscheit möchte ich einfach für alles danken, da sie mir immer eine gute Freundin, Kollegin, und Süßigkeitspenderin in einem war und immer ein offenes Ohr für meine Wewehchen hatte. Besonders ihr Kampfeinsatz beim Finale hat mir noch den letzten Kick gegeben.

Den „Kollegen“ Torsten Ochsenreiter und Achim Quaiser möchte ich für eine witzige und schöne Laborzeit danken und für die Einsicht, dass auch im Chaos die Ruhe liegen kann.

Meinem dritten Kollegen Alex Treusch danke ich für die Erweiterung meines musikalischen Horizonts und dafür, dass er immer meine Ordnungsästhetik im Labor unterstützt hat.

Unserem Mann für alle Fälle, Arnulf Kletzin, danke ich dafür, dass er immer dann noch Einfälle parat hat, wenn allen anderen schon längst die Köpfe rauchen.

Herrn Prof. Dr. Jobst Gmeiner danke ich für seine charmante Art, jeden Tag mit fescher Fliege durch die Labore zu streifen und sich nach unserem Wohl zu erkundigen.

Den „Halos“ von nebenan Peter Zimmermann, Annette Hofacker, Dagmar Gregor, Petra Plösser und Simone Sartorius-Neef danke ich für den humorvollen Zusammenhalt in der Arbeitsgruppe, auch wenn der „Menschenknoten“ leider nicht mehr praktiziert wird.

Gaby Liebing, Bettina Basso und Renate Fröhlich danke ich für die geschickte Organisation des chaotischen Laboralltags.

Unseren Nachwuchswissenschaftlern Sabrina Fröls, Rita Bartossek und Markus Ruffer danke ich für den frischen Wind, den sie in die Arbeitsgruppe gebracht haben.

Meinen Eltern möchte ich ganz besonders danken, die mich während meiner Uni-Zeit immer unterstützt haben und viel Verständnis für mich aufgebracht haben.

Vor allem möchte ich mich auch bei meinem Freund Peer Mönch bedanken, dass er sich stets interessiert nach dem Befinden meiner „Tuberkel“ erkundigt hat und v.a. in der letzten Zeit mit mir gelitten hat.